



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM PŘEDÚPRAVY A NÁSLEDNÉ
HYDROLÝZY VYBRANÝCH
LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLŮ**

STUDY ON PRETREATMENT AND HYDROLYSIS OF SELECTED LIGNOCELLULOSE
MATERIALS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Kovářová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0980/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Bc. Markéta Kovářová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium předúpravy a následné hydrolyzy vybraných lignocelulózových materiálů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše
2. Výběr vhodných materiálů
3. Ověření různých přístupů k jejich hydrolyze
4. Charakterizace připravených hydrolyzátů

Termín odevzdání diplomové práce: 5. 5. 2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Markéta Kovářová
Student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31. 1. 2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem chemické a enzymatické hydrolýzy dřevního materiálu. Cílem práce byl výběr vhodné metody předúpravy lignocelulózového materiálu – odpadních pilin. Teoretická část práce je zaměřena na charakterizaci lignocelulózového materiálu a jeho složek. Také jsou v teoretické části popsány různé metody předúpravy a jejich vliv na hydrolýzu lignocelulózových materiálů.

V experimentální části byl zkoumán nejvhodnější způsob předúpravy a následné hydrolýzy pilin. Kritérii pro výběr vhodné metody byla koncentrace vzniklých redukujících sacharidů – žádaného produktu na jedné straně a na druhé straně polyfenolů jakožto problematického mikrobiálního inhibitoru. Jako optimální postup předúpravy pilin s ukázala inkubace pilin v 96% ethanolu anebo v 5% H_2O_2 , které zvýšili obsah redukujících sacharidů v hydrolyzátech téměř o 30 %, a zároveň nedošlo k dramatickému nárůstu koncentrace polyfenolů. Součástí práce byla také kultivace bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* na hydrolyzátech dřevního materiálu.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on study of chemical and enzymatical hydrolysis of raw wood material. The aim of this work was to find the suitable method for pretreatment of selected lignocellulose materials. The theoretical part deals with characterization of lignocellulosic material and its components. There are also subscribed various pretreatment methods and their effect on hydrolysis of sawdust.

In experimental part of the work the most appropriate approach of pretreatment and hydrolysis of sawdust was studied. Criteria for the selection of suitable method was concentration of saccharides as desired product of hydrolysis and also concentration of the most important microbial inhibitors - polyphenols. Application of 96% ethanol or 5% H_2O_2 were identified as the most promising pretreatment methods which enhanced yields of fermentable sugars about 30 %. Further, we also performed cultivation of bacteria *Burkholderia cepacia* and bacteria *Burkholderia sacchari* using solution obtained by hydrolysis of lignocellulose material.

KLÍČOVÁ SLOVA:

předúprava, chemická hydrolýza, enzymatická hydrolýza, piliny, lignocelulóza, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, spektrofotometrie, plynová chromatografie

KEYWORDS:

pretreatment, chemical hydrolysis, enzymatical hydrolysis, sawdust, lignocellulose, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, spectrophotometry, gas chromatography

KOVÁŘOVÁ, M. *Studium předúpravy a následné hydrolýzy vybraných lignocelulózových materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 74 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a všestrannou pomoc při řešení problémů při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým konzultantům Ing. Danu Kučerovi a Ing. Pavle Benešové, kteří mi velmi pomohli s experimentální částí této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Lignocelulózová biomasa	8
2.1.1. Vliv předúpravy	8
2.1.2. Zpracovatelnost lignocelulózové biomasy	8
2.1.3. Složení lignocelulózového materiálu	9
2.2. Typy biomasy a jejich vlastnosti	12
2.2.1. Suroviny obsahující lignocelulózu	13
2.2.2. Suroviny získané předúpravou	13
2.3. Předúprava lignocelulózových materiálů	16
2.3.1. Cíle předúpravy	16
2.3.2. Hodnocení předúpravy	17
2.3.3. Metody předúpravy	17
2.4. Faktory ovlivňující hydrolýzu	21
2.5. Enzymatická hydrolýza lignocelulózové biomasy	22
2.5.1. Substrátové faktory	23
2.5.2. Enzymové faktory	23
2.5.3. Enzymatická hydrolýza celulózy	23
2.5.4. Inhibitory enzymatické hydrolýzy lignocelulózových materiálů	23
3. Experimentální část	26
3.1. Mikrobiální kmeny, chemikálie a přístrojové vybavení	26
3.1.1. Použité mikrobiální kmeny	26
3.1.2. Použité komerčně dostupné enzymy	26
3.1.3. Použité chemikálie	26
3.1.4. Přístroje a pomůcky	26
3.2. Použité metody	27
3.2.1. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3, 5 - dinitrosalicylové	27
3.2.2. Stanovení polyfenolů pomocí Folin – Ciocalteova činidla	28
3.2.3. Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie (GC)	28
3.3. Metody předúpravy a enzymatická hydrolýza	29
3.3.1. Chemická předúprava	29
3.3.2. Fyzikálně-chemická předúprava - Tepelná předúprava	31
3.3.3. Optimalizace metod: luhování v NaOH, H ₂ O ₂ a ethanol	33
3.3.4. Kultivace bakterií <i>Burkholderia sacchari</i> a <i>Burkholderia cepacia</i>	33
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1. Kalibrace metod	35
4.1.1. Stanovení redukujících cukrů pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové	35
4.1.2. Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin – Ciocalteova činidla	36
4.1.3. Stanovení obsahu P(3HB) v biomase pomocí plynové chromatografie	37
4.2. Metody předúpravy (chemická hydrolýza)	38
4.2.1. Hydrolýza kyselinou (H ₂ SO ₄)	38

4.2.2. Kombinace: předúprava kyselinou a sonifikace	39
4.2.3. Alkalická předúprava (pomocí NaOH)	40
4.2.4. Předúprava pomocí organických rozpouštědel – kyselina octová, 96 % ethanol	41
4.2.5. Amoniakální exploze	42
4.2.6. Exploze vodní parou	43
4.2.7. Oxidační předúprava (pomocí H ₂ O ₂)	44
4.2.8. Optimalizace metod: luhování v NaOH, H ₂ O ₂ a v ethanolu	45
4.3. Enzymatická hydrolýza	49
4.3.1. Exploze vodní parou	49
4.3.2. Kyselá hydrolýza (pomocí 2 % H ₂ SO ₄)	52
4.3.3. Alkalická předúprava (pomocí NaOH)	53
4.3.4. Oxidační předúprava – luhování v H ₂ O ₂	56
4.3.5. Organická rozpouštědla	58
4.3.6. Optimalizace metod – luhování v NaOH, H ₂ O ₂ a ethanolu	60
4.4. Biotechnologická produkce PHB na hydrolyzátech	65
4.4.1. Stanovení redukujících sacharidů	65
4.4.2. Stanovení polyfenolů	66
4.4.3. Výtěžky biomasy a PHB	66
5. ZÁVĚR	69
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	71
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	74

1. ÚVOD

Lignocelulózová biomasa představuje jeden z nevyužitých zdrojů například pro výrobu bioplynu, produkci ethanolu, ale také řadu nejen biotechnologických výrob. Hodně faktorů, jako je například obsah ligninu, krystalinita celulózy a velikost částic, omezují zpracovatelnost hemicelulózy a celulózy, které jsou hlavními využitelnými frakcemi přítomnými v lignocelulózové biomase

Účelem předúpravy je zvýšení zpracovatelnosti lignocelulózových materiálů. Lignocelulózové materiály se skládají ze tří typů polymerů, a to celulózy, hemicelulózy a ligninu. Tyto tři složky jsou navzájem propojeny. Každý typ předúpravy má svůj specifický efekt na celulózu, hemicelulózu a na lignin. Existuje mnoho způsobů, jak zvýšit zpracovatelnost biomasy. Patří k nim hlavně předúprava vodní parou, kyselinou, předúprava horkou vodou, předúprava pomocí amoniaku. Tyto metody jsou považovány za nejslibnější. Obecně platí, že hlavní efektem je solubilizace hemicelulózy a změna struktury ligninu, což navyšuje schopnosti hydrolytických enzymů vázat se na celulózu a následně ji hydrolyzovat za vzniku fermentovatelných sacharidů.

Předúprava by měla zlepšit tvorbu cukrů nebo schopnost následně tvořit cukry pomocí hydrolýzy. Měla by být účinná v širokém rozsahu a měla by vést k obnovení většiny lignocelulózových složek v použitelné formě v oddělených frakcích. Mělo by vzniknout žádné nebo omezené množství degradovaného ligninu, aby nebyl inhibován růst fermentačních mikroorganismů nebo působení hydrolytických enzymů. Ideální metoda předúpravy by také měla zabránit degradaci sacharidů nebo jejich ztrátě, zabránit tvorbě vedlejších produktů, které jsou často inhibitory při následné hydrolýze a fermentačních procesech. Také by měla být nákladově efektivní - mít nízké investiční a provozní náklady. Zároveň by metoda měla mít nízké požadavky na potřebnou energii, nebo by měla být provedena tak, aby energie vložená mohla být použita pro další účely.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Lignocelulózová biomasa

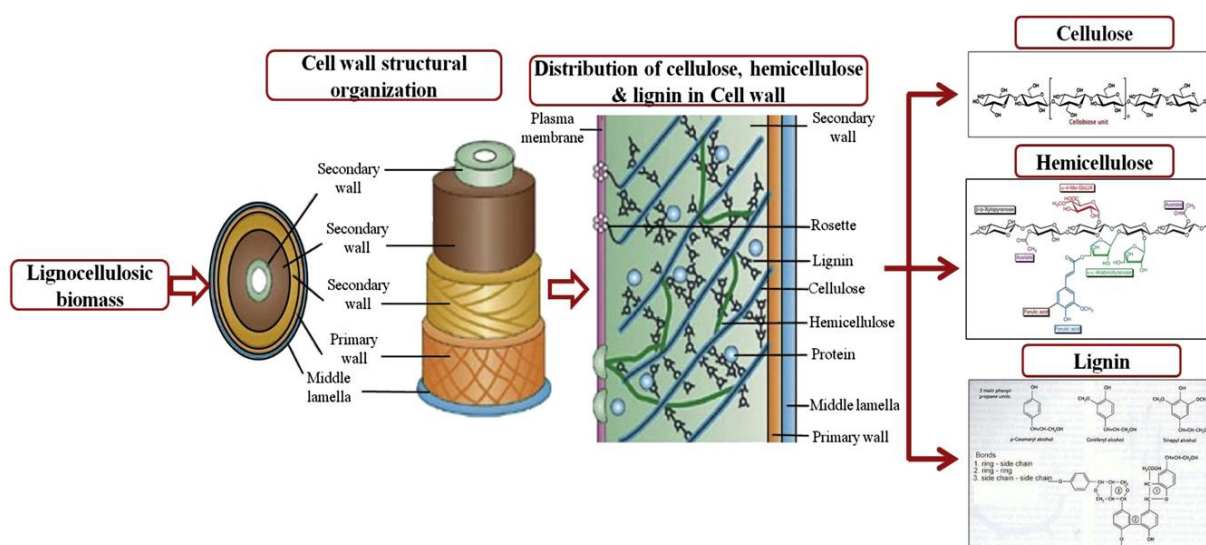
Lignocelulózová biomasa představuje jeden z nevyužitých zdrojů například pro výrobu bioplynu, produkci ethanolu, ale také řadu nejen biotechnologických výrob. Hodně faktorů, jako je například obsah ligninu, krystalinita celulózy a velikost částic, omezují zpracovatelnost hemicelulózy a celulózy, které jsou hlavními využitelnými frakcemi přítomnými v lignocelulózové biomase. [1]

2.1.1. Vliv předúpravy

Účelem předúpravy je právě zvýšení zpracovatelnosti lignocelulózových materiálů. Každá předúprava má svůj specifický efekt na celulózu, hemicelulózu a na lignin, což jsou tři hlavní složky lignocelulózové biomasy. Existuje mnoho způsobů jak zvýšit zpracovatelnost této biomasy. Patří k nim hlavně předúprava vodní parou, kyselinou, předúprava horkou vodou, předúprava pomocí amoniaku. Tyto metody jsou považovány za ty, které mají nejvyšší potenciál k tomu, aby byly dále využívány. Hlavní efektem je pak solubilizace hemicelulózy a změna struktury ligninu, což navyšuje schopnosti hydrolytických enzymů vázat se na celulózu. [1]

2.1.2. Zpracovatelnost lignocelulózové biomasy

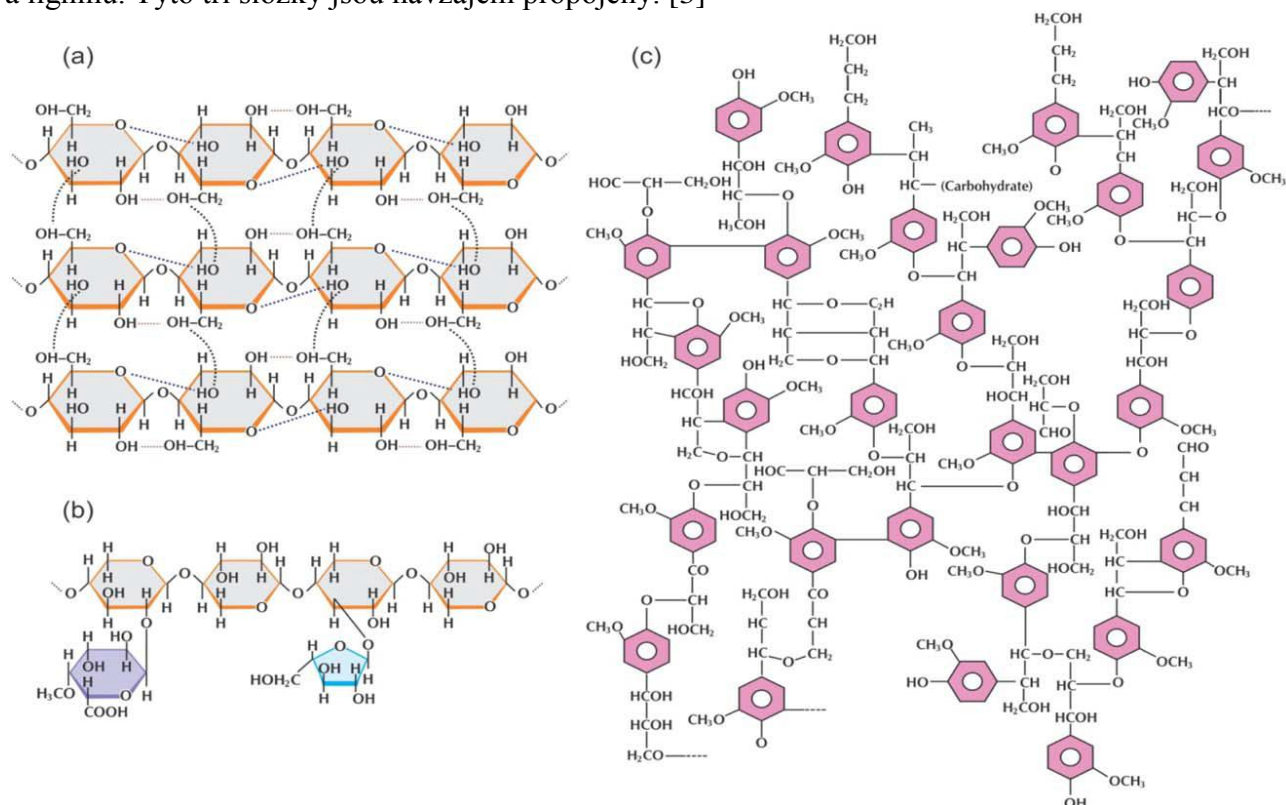
Po dlouhou dobu byly prováděny výzkumy na zlepšení zpracovatelnosti lignocelulózové biomasy, a to zejména pro efektivní konverzi (hemi-)celulózy na ethanol, methan, a v posledních letech také na vodík. Nicméně stále není jasné, které charakteristické rysy lignocelulózové biomasy jsou ty nejdůležitější pro určení správné a úspěšné předúpravy. Dále také třeba vyřešit problémy jako je například produkce inhibičních produktů. Cílem výzkumu je určení nejdůležitějších vlastností lignocelulózové biomasy a pomocí nich následně vybrat vhodný způsob jejího zpracování tak, aby bylo efektivní a atraktivní pro uplatnění v biotechnologických výrobcích. [1]



Obrázek 1: Ilustrace složení lignocelulózy [2]

2.1.3. Složení lignocelulózového materiálu

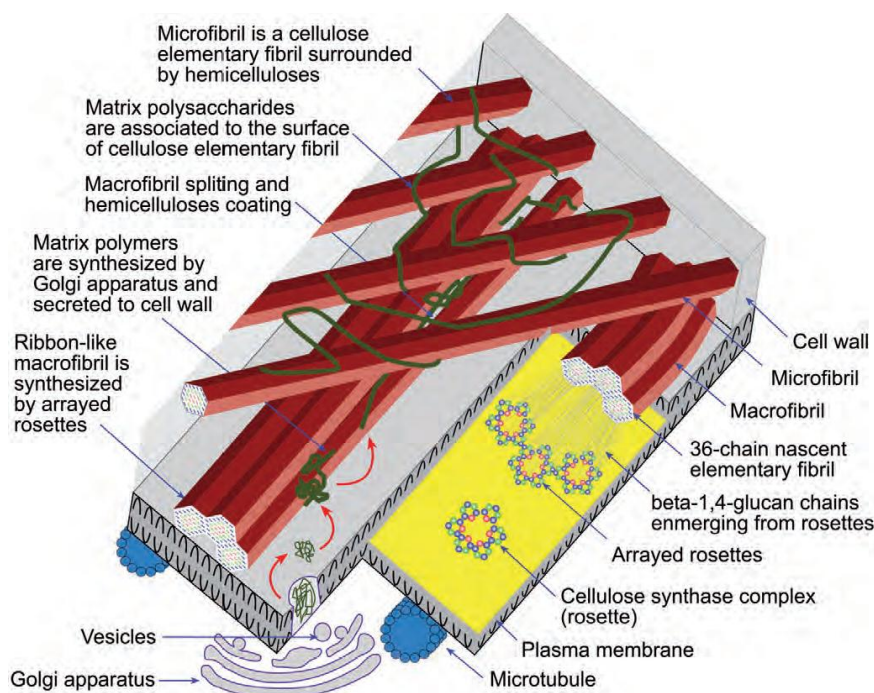
Lignocelulózové materiály se skládají ze tří typů polymerů, a to celulózy, hemicelulózy a ligninu. Tyto tři složky jsou navzájem propojeny. [3]



Obrázek 2: Chemická struktura a) celulózy, b) hemicelulózy, c) ligninu. [3]

2.1.3.1. Celulóza

Celulóza je hlavní složkou stěny rostlinné buňky a poskytuje jí tak pevnost a strukturní oporu. Také je přítomna u bakterií, hub a řas. Celulóza existuje jako D – glukózové podjednotky spojené β – 1,4 glykosidickými vazbami. V rostlinách je složena z částí s krystalicky organizovanou strukturou a z částí, které nejsou tak dobře organizovány – amorfní struktury. Celulózové kmeny jsou „svázaný“ dohromady a tvoří takzvaná celulózová vlákna nebo celulózové svazky. Tato vlákna jsou většinou nezávislá a vázána přes vodíkové můstky. [1, 4]



Obrázek 3: Model buněčné stěny elementárních fibril celulózy a její syntézy. Rozměry fibril jsou odhadovány na $3 \times 5,5 \text{ nm}$ [5]

Stupeň polymerace celulóзовých řetězců v přírodě se pohybuje v rozmezí od 10 000 glukopyranózových jednotek ve dřevě po 15 000 v přírodní bavlně. Opakujícími se jednotkami v celulóзовém řetězci jsou disacharid celobióza, jako opak ke glukóze v dalších glukánových polymerech. Celulóзовé řetězce jsou seskupeny dohromady tak, aby vytvořily mikrofibrily, které společně tvoří celulóзова vlákna. Celulóзовé mikrofibrily jsou většinou nezávislé, ale ultrastruktura celulózy je do značné míry ovlivněna přítomností kovalentních vazeb, vodíkových můstků a Van der Waalsových sil. Vodíkové vazby v celulóзовých mikrofibrilách určují pevnost řetězce, ale mezi-řetězcové vodíkové vazby mohou způsobit pořádek (krystalická struktura) nebo zavést poruchy (amorfní) do struktury celulózy. [4]

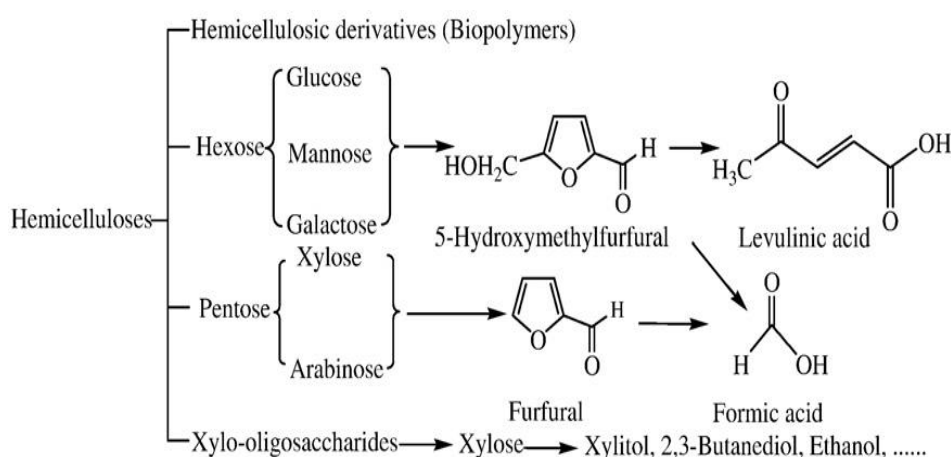
2.1.3.2. Hemicelulóza

Hemicelulóza je druhý nejhojnější polymer v přírodě (20–50% lignocelulóзовé biomasy) a liší se od celulózy v tom, že není chemicky homogenní. Slouží jako spojení mezi ligninem a celulóзовými vlákny, a tak dává pevnost celému systému celulóza – hemicelulóza – lignin. Hemicelulóza je komplex karbohydrátové struktury, která se skládá z různých monomerů, jako jsou pentózy (například xylóza a arabinóza), hexózy (jako je mannóza, glukóza a galaktóza), a uronových kyselin. V porovnání s celulózou má nižší molekulovou hmotnost a větví se krátkými bočními řetězci, které jsou složeny z různých monosacharidů a jsou snadno hydrolyzovatelné. Hemicelulózy se navzájem liší ve složení. Dominantní složkou hemicelulózy z tvrdého dřeva a zemědělských plodin, jako jsou trávy a sláma, je xylan, zatímco u měkkého dřeva je hlavní složkou glukomanan. [1, 4, 6]

Rozpustnost jednotlivých hemicelulóзовých sloučenin je v sestupném pořadí následující: manózy, xylózy, glukózy, arabinózy a galaktózy. Rozpustnost se zvyšuje se zvyšující se teplotou. Rozpustnost jednotlivých složek hemicelulózy ve vodě je za neutrálních podmínek 180°C . Avšak také je zjištěno, že při 150°C se již rozpouští část jejích složek.

Rozpouštění lignocelulózových složek záleží nejen na teplotě, ale i na dalších aspektech jako je například obsah vlhkosti a pH.

Xylany jsou v mnoha rostlinách heteropolysacharidy s β – 1, 4 – D – xylopyranozovými jednotkami. Kromě xylózy může xylan obsahovat také arabinózu, kyselinu glukuronovou nebo její 4 – O – methyl ether, kyselinu octovou, ferulovou a p – kumarovou kyselinu. Xylan může být z hemicelulózy extrahován velmi dobře a to v prostředí kyseliny nebo zásady, zatímco glukomanan lze extrahovat v kyselém prostředí jen s těžší – potřebuje silnější alkalické prostředí než jaké je potřeba k extrakci xylanu. Xylan se tedy jeví být tou částí, která může být nejsnáze extrahována. Ze spojení celulózy, hemicelulózy a ligninu jsou hemicelulózy nejvíce teplotně a chemicky citlivé. Během tepelně-chemické předúpravy reagují nejdříve boční skupiny hemicelulózy, následně reaguje hlavní řetězec hemicelulózy. [1, 4]

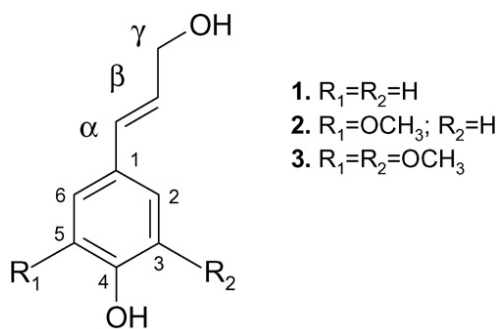


Obrázek 4: Potencionální produkty z hemicelulózy [6]

Hemicelulózy uvnitř buněčné stěny rostlin jsou uspořádány tak, že tvoří obal celulóзовých vláken a bylo zjištěno, že odstraněním nejméně 50 % hemicelulóz podstatně zvýší hydrolyzovatelnost celulózy. Nicméně parametry těchto procesů musí být nastaveny tak, aby se zabránilo tvorbě hemicelulázových degradačních produktů, jako jsou furfuraly a hydroxymethyl furfuraly, které jsou známy jako inhibitory fermentačních procesů. Z tohoto důvodu jsou podmínky předběžných úprav většinou kompromisem tak, aby se maximalizovala výtěžnost cukrů, a v závislosti na typu předúpravy může být hemicelulóza získána buď jako pevná frakce, nebo jako kombinace pevné i kapalné frakce. [4]

2.1.3.3. Lignin

Lignin je po celulóze a hemicelulóze jeden z nejhojnějších polymerů v přírodě a je přítomný v buněčné stěně. Je to amorfni heteropolymer a skládá se z různých fenylpropanových jednotek (p – kumaryl, coniferyl a sinapyl alkohol), které spolu drží pohromadě pomocí různých druhů vazeb. Hlavním účelem ligninu je poskytnout rostlině strukturální podporu, nepropustnost a odolnost proti mikrobiálnímu napadení a oxidativnímu stresu. Amorfni heteropolymer je také nerozpustný ve vodě a opticky neaktivní. Toto vše dělá lignin velmi těžce odbouratelným. [1, 7]



Obrázek 5: Monomery ligninu [7]

Stejně jako hemicelulóza se lignin začíná za neutrálních podmínek ve vodě rozpouštět okolo 180 °C. Rozpustnot ligninu v kyselém, neutrálním nebo alkalickém prostředí závisí však na dominantním prekursoru (p – kumaryl, coniferyl a sinapyl alkohol) ligninu. [1]

Vzhledem k jeho úzkému spojení s celulóзовými mikrofibrilami bývá lignin označován jako hlavní problém při enzymatické a mikrobiální hydrolýze lignocelulóзовé biomasy. Čím více ligninu je odstraněno, tím větší je stravitelnost a zpracovatelnost biomasy. Kromě toho, že je fyzickou bariérou, patří mezi jeho škodlivé účinky také: nespecifická adsorpce hydrolytických enzymů k ligninu, rušení a neproduktivní vazba celulóзовých enzymů k ligninovým karbohydrátovým komplexům a toxicita ligninových derivátů k mikroorganismům. [4]

Různé suroviny obsahují různé množství ligninu, který musí být pro zlepšení zpracovatelnosti biomasy odstraněn pomocí předběžného zpracování. Předpokládá se, že se lignin v průběhu předběžného zpracování roztaví a během chlazení jsou jeho vlastnosti změněny, což může znamenat jeho vysrážení. Delignifikace (extrakce ligninu chemickými látkami) způsobí „otok“ biomasy, následné narušení struktury ligninu, zvýšení plochy vnitřního povrchu a zvýšenou dostupnost celulóických enzymů k celulóзовým vláknům. I když ne všechny předúpravy způsobí úplnou delignifikaci, struktura ligninu může být změněna bez extrakce v důsledku změn v chemických vlastnostech ligninu. Předběžně ošetřená biomasa se pak stává náchylnější k hydrolýze než surová biomasa, i když může mít přibližně stejný obsah ligninu jako biomasa bez předběžné úpravy. [4]

2.2. Typy biomasy a jejich vlastnosti

Různé typy biomasy, jako jsou dřeviny, byliny, trávy, vodní rostliny, zemědělské plodiny a zbytky, komunální odpad a hnoje, obsahují různé množství celulózy, hemicelulózy, ligninu a dalších extrahovatelných látek.

Rostlinná biomasa obecně obsahuje 40–50% celulózy (s výjimkou několika rostlin jako jebavlna a konopná vlákna, která jsou tvořena až z 80% celulózou), 20 až 40% hemicelulózy a 20–30% ligninu. Obsah ligninu a celulózy – její přístupnost pro celulózy a její krystalinita jsou vlastnosti, které stanovují celkovou zpracovatelnost biomasy. Komplexnost daného typu biomasy je odražena ve vztahu mezi jeho strukturálními a karbohydrátovými složkami. Mezi faktory, které přispívají k těžkému rozložení biomasy, patří: krystalinita, přístupný povrch (nebo porozita), ochrana celulózy ligninem, krytí hemicelulózy celulózou a pevnost vláken. Právě tato variabilita odpovídá za rozdíly ve zpracovatelnosti/hydrolýze dané suroviny.

Odstranění ligninu zvyšuje enzymatickou hydrolyzovatelnost biomasy až do okamžiku, kdy účinek přítomného ligninu není dostatečný pro omezení enzymatické hydrolýzy nebo mikrobiální stravitelnosti. Také bylo prokázáno, že více krystalická celulóza je méně přístupná celulázám a její zastoupení je tudíž jedním z nejdůležitějších (rychlost omezujících) faktorů enzymatické hydrolýzy, u které je minimalizován vliv ligninu. Problémem není často dosažení vysokých výtěžků fermentovatelných cukrů, ale spíše získávání dobrých výnosů za nízké spotřeby energie. Úsilí v oblasti výzkumu by tudíž mělo být zaměřeno na zmenšení velikosti a na fyzikálně - chemické předčištění s cílem zlepšit přímé mikrobiální využití polysacharidů a výnosy cukrů po enzymatickém zcukernatění. [3, 4]

2.2.1. Suroviny obsahující lignocelulózu

Mezi nejdůležitější lignocelulózové suroviny patří energetické plodiny, zemědělské zbytky a odpady.

K zemědělským zbytkům patří například vylisovaná cukrová třtina, sláma a lesnické zbytky. Mezi odpady se řadí netříděný komunální odpad, papír, lepenka, potraviny a zahradní odpady. K energetickým plodinám se vztahuje další kapitola. [8]

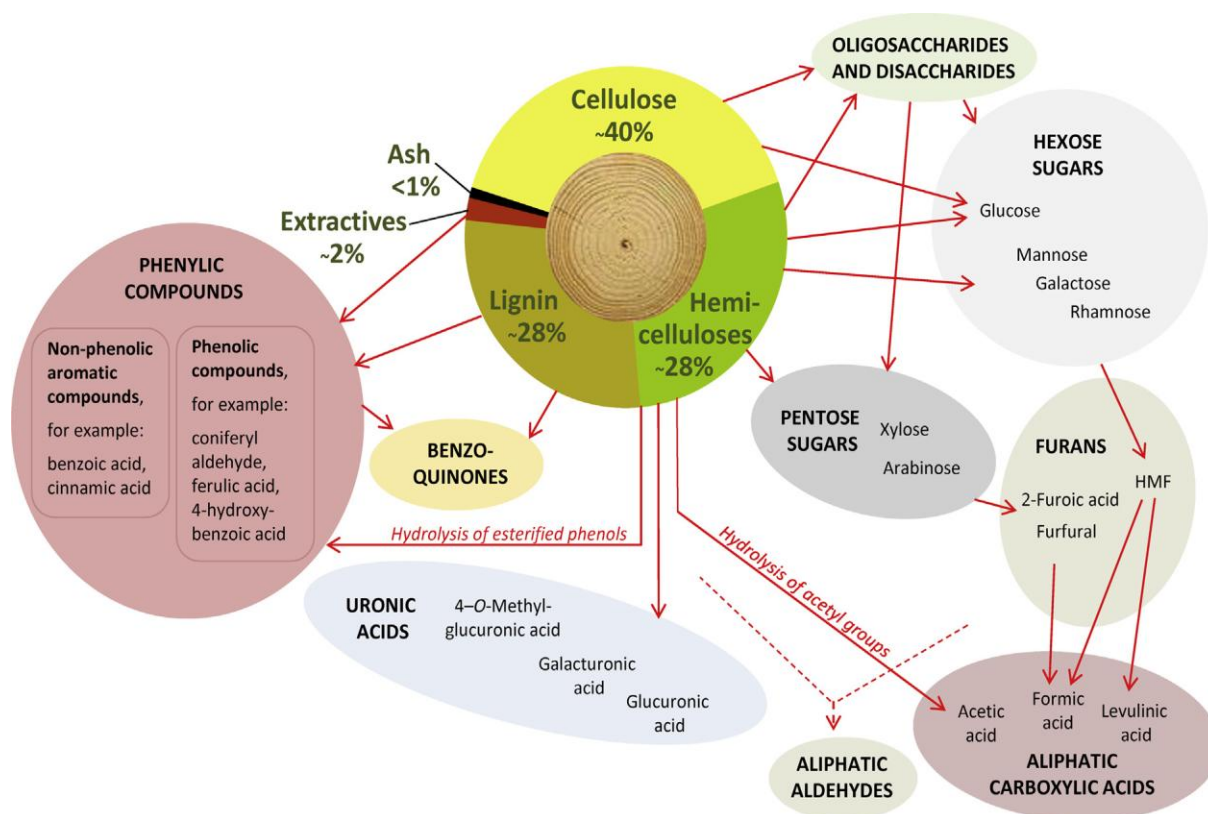
2.2.1.1. Energetické plodiny

Hlavními energetickými plodinami, o které se zajímáme, mohou být klasifikovány buď jako dřeviny nebo travnaté (bylinné) suroviny. Ty mohou být také klasifikovány podle jejich fotosyntetických cest, buď jako C3 nebo jako C4 rostliny.

Dřeviny se rozdělují na tvrdé dřeviny (například listnaté stromy jako dub) nebo měkké dřeviny (například jehličnany). V jehličnanech je galaktoglukomannan hlavní složkou hemicelulózy a představuje zhruba 20 % celkové hmotnosti. V měkkém dřevě jsou také přítomné arabinoxylany, ale v nižších množstvích. Ve tvrdém dřevě jsou hlavní složkou hemicelulózy xylany a bylo zjištěno, že těmito xylany je spíše glukoronoxytan než arabinoxylan. Koncentrace těchto xylanů v tvrdém dřevě se pohybuje mezi 15–30% hmotnosti. [8]

2.2.2. Suroviny získané předúpravou

Obecně lze předpokládat, že lignocelulózové suroviny obsahují asi 40% uhlíku vázaného jako celulóza, 30 % jako lignin a 26 % jako hemicelulózy a další polysacharidy. Zatímco celulóza je jednotná součást většiny typů celulózové biomasy, tak rozměry a složení hemicelulóz a ligninu se liší mezi druhy. Chemické rozdíly mezi různými surovinami mají zásadní vliv na tvorbu inhibitorů během předúpravy. [9]

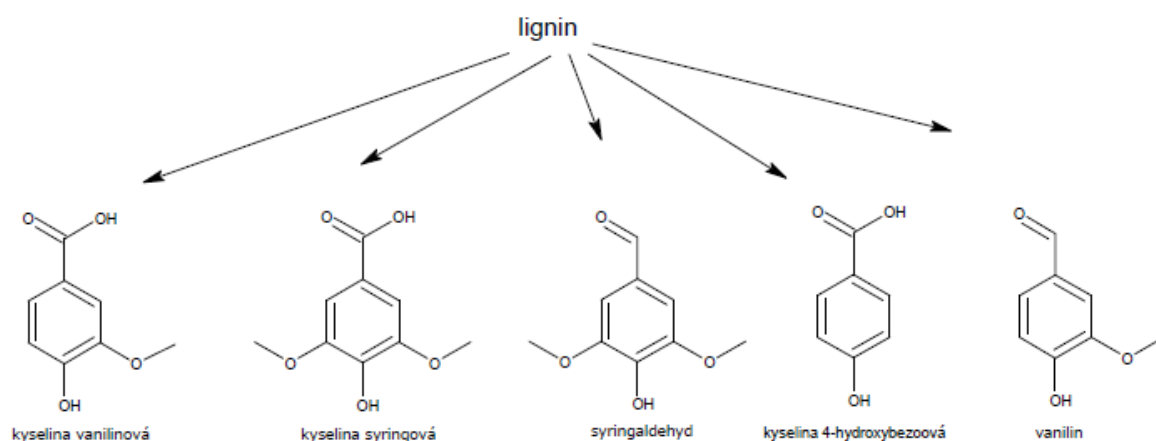


Obrázek 6: Degradační produkty z lignocelulózy v důsledku předběžného zpracování v kyselém prostředí. Čísla ukazují frakce složek dřeva smrku ztepilého. Šipky ukazují cesty formace [9]

Tyto látky lze obecně rozdělit do tří skupin:

- 1) alifatické kyseliny, které vznikly degradací sacharidu a ligninu
- 2) furanové deriváty, které vznikly degradací sacharidů
- 3) fenolové sloučeniny a jejich deriváty, pocházející z ligninu [10]

Produkty degradace ligninu jsou zastoupeny v různých koncentracích v závislosti na materiálu (na rostlině). Nejčastěji se vyskytuje 4-hydroxybenzaldehyd, kyselina hydroxybenzoová, vanilin, syringaldehyd, koniferylaldehyd, kyselina vanilová, syringová a skořicová. [10]

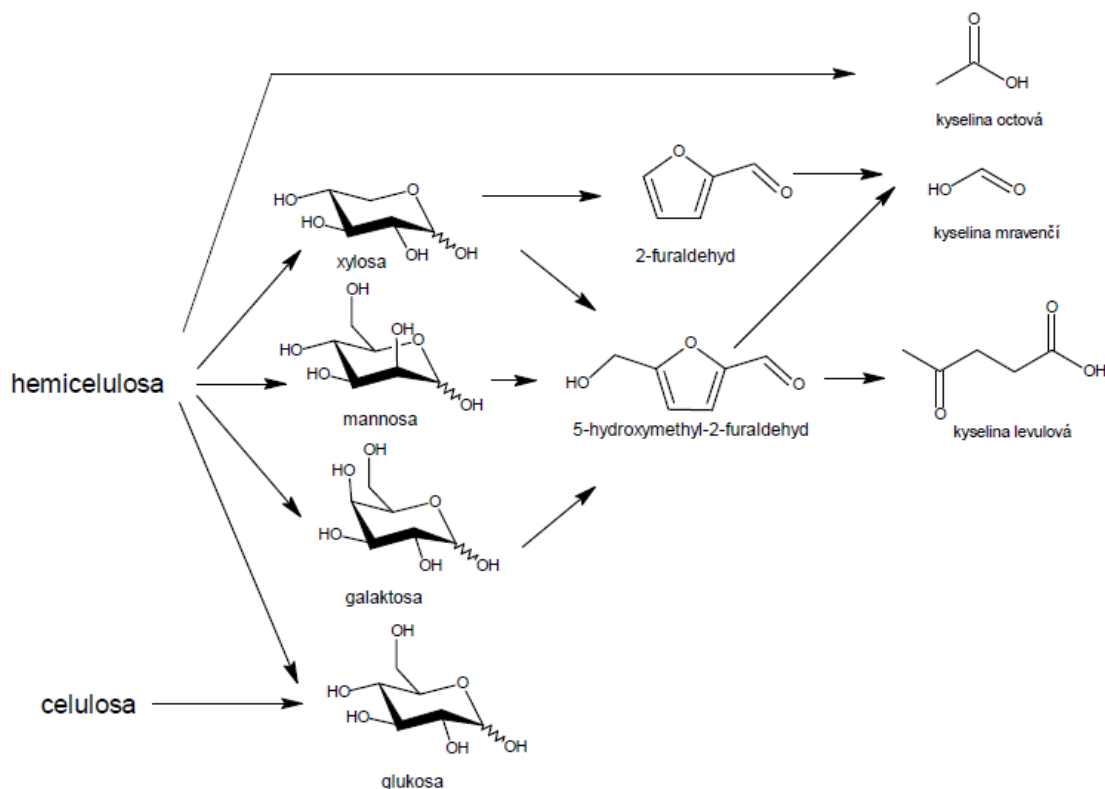


Obrázek 7: Produkty degradace ligninu [10]

Hydrolýza hemicelulóz vede k tvorbě pentóz (převládá u tvrdého dřeva a jednoletých rostlin), hexóz (zejména u měkkého dřeva) a uronové kyseliny. [9]

Po rozkladu celulózy a hemicelulózy dochází k degradaci hexóz z nich vzniklých. Tak vzniká především 5 – hydroxymethyl – 2 – furaldehyd. Také dochází k degradaci pentóz a vzniká 2 – furaldehyd.

Jejich dalším rozkladem vzniká kyselina mravenčí, z 2 – furaldehydu se navíc tvoří ještě kyselina levulová. Při rozkladu hemicelulózy dochází k uvolnění kyseliny octové. [10]



Obrázek 8: Produkty degradace hemicelulózy a celulózy [10]

2.2.2.1. Extrakty

Dřevinové extrakty je heterogenní skupina sloučenin, které lze získat s polárními nebo nepolárními rozpouštědly. Ty se skládají především z terpenů, tuků, vosků a fenolů. Jejich obsah a složení se liší mezi jednotlivými druhy, jejich umístění a podle roční doby. Jsou přítomny v malých množstvích, ale mají zásadní význam pro některé vlastnosti biomasy – například barva, zápach a ochrana před parazity. [9]

2.2.2.2. Anorganické složky

Obsah anorganických látek dřeva je stanoven jako popel zbývající po spalování vzorku. Popel je obsažen okolo 0,1–1% ve dřevě z mírných pásů a tvoří až 5% u tropických druhů. Některé zemědělské zbytky mohou mít obsah popela nad 15%. Obsah popela v těchto produktech může být částečně ovlivněn znečištěním půdy. [9]

2.2.2.3. Vedlejší produkty

V průběhu předúpravy jsou provozní podmínky vyladěny pro odstranění hemicelulóz a/nebo ligninu z lignocelulózové matrice tak, aby se dosáhlo dobré enzymatické zpracovatelnosti celulózy. Nicméně, touto optimalizací jsou také ovlivněny jiné faktory. Například dosažení vysokého stupně rozpustnosti hemicelulózy a/nebo ligninu nevyhnutelně vede k degradaci solubilizovaných fragmentů, které jsou důsledkem podmínek, kterým jsou vystaveny. Množství a povaha produktů vytvořených rozkladem, z nichž mnohé mají inhibiční účinky na down-stream biokatalické procesy, je v přímém vztahu ke způsobu předúpravy a podmínkám, jež při ní byly nastaveny. [9]

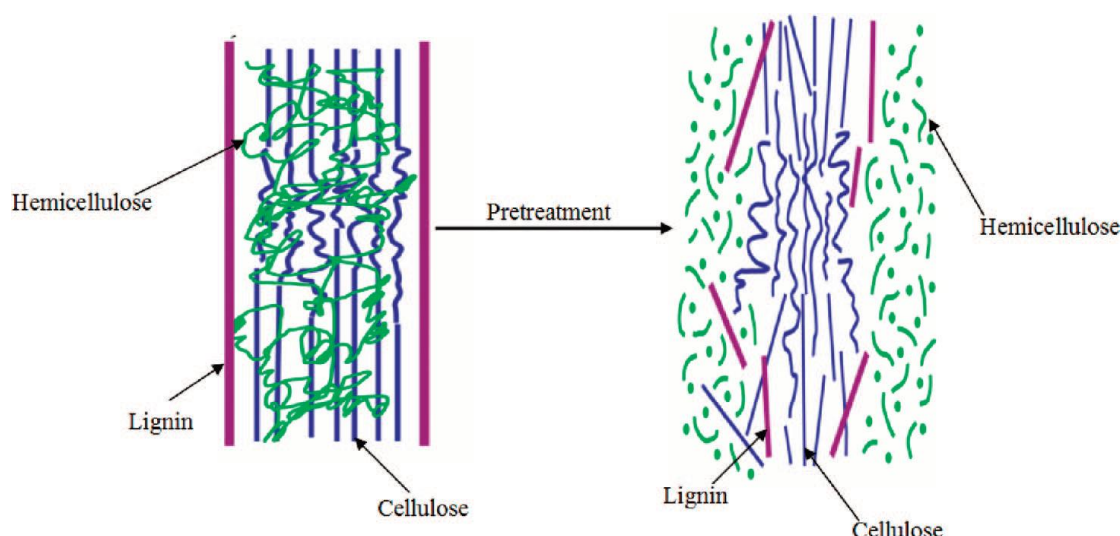
2.3. Předúprava lignocelulózových materiálů

Existuje celá řada klíčových způsobů pro efektivní předúpravu lignocelulózové biomasy před její následnou hydrolýzou za účelem fermentace. Proces předúpravy by měl mít nízké investiční a provozní náklady. Měla by být účinná v širokém rozsahu a měla by vést k obnovení většiny lignocelulózových složek v použitelné formě v oddělených frakcích. Mělo by vzniknout žádné nebo omezené množství cukrů a degradovaného ligninu, aby nebyl inhibován růst fermentačních mikroorganismů nebo působení hydrolytických enzymů. Zároveň by metoda měla mít nízké požadavky na potřebnou energii nebo by měla být provedena tak, aby energie vložená mohla být použita pro další účely, jako je například sekundární vytápění. [4]

Bylo studováno mnoho typů předúprav a mnohé jsou stále ve vývoji. Je obtížné komplexně hodnotit a porovnávat tyto technologie, protože zahrnují cenu upstream a downstream procesů, investiční kapitál, chemickou recyklaci a systémy nakládání s odpadem. [4]

2.3.1. Cíle předúpravy

Účinky předběžného zpracování lignocelulózových materiálů jsou již po dlouhou dobu uznávány za prospěšné. Cílem tohoto procesu je odstranění ligninu a hemicelulózy, snížení krystalinity a celulózy a zvýšení porozity lignocelulózových materiálů.



Obrázek 9: Schématické znázornění role předúpravy pro konverzi biomasy [11]

Předúprava musí splňovat následující požadavky:

Zlepšení tvorby cukrů nebo schopnosti následně tvořit cukry pomocí hydrolýzy.

Zabránit degradaci nebo ztrátě sacharidů.

Zabránit tvorbě vedlejších produktů, které jsou inhibitory při následné hydrolýze a fermentačních procesech. Měla by být nákladově efektivní. [11]

2.3.2. Hodnocení předúpravy

Teoreticky ideálním procesem předúpravy je produkován narušený, hydratovaný substrát, který snadno hydrolyzuje, ale zabraňuje degradaci cukrů a vzniku mikrobiálních inhibitorů. Posouzení procesů předběžných úprav závisí na parametru zvaném „kritický faktor“. Tento faktor je definován jako kombinace teploty, kyselosti a doby trvání předúpravy. [4]

Hodnocení předúpravy je složeno z:

- 1) analýza cukrů (monomery i oligomery) uvolněných v kapalině a obsah karbohydrátů ve vodě nerozpustných pevných látkách po předúpravě
- 2) enzymatická hydrolýza promytých nebo nemytých pevných látek
- 3) fermentace kapaliny po předúpravě, která se posuzuje přímo nebo zředěná na cílovou koncentraci a inhibice fermentujících mikroorganismů s ohledem na růst
- 4) posouzení dalších biotechnologických potenciálů frakcí předúpravy, jako jsou výrobky s přidanou hodnotou. Například pevné látky, které byly získány po předúpravě amoniakem, mohou být použity jako doplněk krmiva pro dobytek. [5]

2.3.3. Metody předúpravy

Klasifikace metod předběžných úprav je založena na pH, podle kterého se dělí na: kyselé, alkalické a neutrální předúpravy. Zobecněná klasifikace metod prav je: fyzikální, chemické, biologické a vícenásobné nebo kombinované metody. U kombinovaných metod jsou fyzikální parametry, jako teplota, tlak nebo biologický krok, kombinovány s chemickými přístupy a jsou označovány jako fyzikálně-chemické nebo biochemické metody předúpravy. Kombinací těchto přístupů se zvýší zpracovatelnost biomasy a často jsou používány k navrhování předních technologií předúprav. [4, 12]

2.3.3.1. Fyzikální předúprava

Rozmělňování

Zmenšení velikosti, sekání, drcení a mletí patří k mnoha mechanickým způsobům používaným ke snižování velikosti, jež jsou používány pro zvýšení zpracovatelnosti lignocelulózové biomasy. Tyto přístupy zvýší dostupný specifický povrch, sníží jak stupeň polymerace celulózy, tak i její krystalinitu. Takové zpracování zmenšuje velikost lignocelulózové biomasy z velkých kusů na velikost cca 10–50 mm, štěpkování zmenšuje velikost na 10–30 mm a při frézování se může velikost částic zmenšit až na 0,2–2 mm. Nicméně bylo prokázáno, že další snížení velikosti částic biomasy pod 0,4 mm má malý vliv na cenu a na výtěžky hydrolýzy biomasy. Cílem mletí je redukce tepla a limitů přenosu hmoty. Mletí je účinnější ve snížení velikosti částic a narušení krystalinity celulózy než štěpkování, a to pravděpodobně v důsledku střížných sil vzniklých při mletí. Typ a doba mletí, jakožto druh biomasy určují zvýšení specifického povrchu, konečný stupeň polymerace a narušení sítě v narušení krystalinity celulózy. Tyto faktory zvyšují celkový výtěžek hydrolýzy lignocelulózy ve většině případů o 5–25%, ale také redukuje čas technického zpracování o 23–59% (tedy zvýší rychlost hydrolýzy). Vibrační mletí je mnohem účinnější než běžné mletí při snižování krystalické struktury celulózy ve smrkovém dřevě. [1, 4]

2.3.3.2. Biologická předúprava

Biologické metody předúprav jsou většinou spojeny s působením hub, které jsou schopné produkce enzymů, jež mohou degradovat lignin, hemicelulózu a polyfenoly. Nejúčinnější plísně jsou bílé plísně, protože právě ony rozkládají lignocelulózový materiál. Hnědé plísně mají především vliv na celulózu, a to vzhledem k tomu, že bílé napadají jak lignin, tak celulózu, a to díky produkci enzymů jako jsou lignin peroxidázy, polyfenol oxidázy, peroxidázy a lakázy, které degradují lignin. K delignifikaci biomasy již byly dříve použity plísně *Phanerochaete chrysosporium* nebo například *Phlebia radiata*. Rychlost biologické předúpravy je ale bohužel pro průmyslové využití pomalá. [4, 12]

2.3.3.3. Chemická předúprava

Do této kategorie patří úprava pomocí zásad, kyselin (převážně zředěných), oxidačních činidel a organických rozpouštědel. [11]

Alkalická předúprava

Některé chemikálie, jako jsou například kyseliny, alkalické kovy, organická rozpouštědla a iontové kapalné látky, mají vliv na nativní strukturu lignocelulózové biomasy. Během předúpravy pomocí zásad bývá mezi prvními reakcemi solvatace. Předúprava za použití alkálií (např. NaOH, KOH, Ca(OH)₂, hydrazin, bezvodý amoniak) způsobují zduření biomasy, což znamená zvětšení vnitřního povrchu a snížení, jak stupně polymerace celulózy, tak i její krystalinitu. [1, 4]

Při rozpouštění v silně koncentrovaných zásadách dochází k odštěpování koncových skupin, alkalické hydrolýze a také může dojít k degradaci a rozkladu rozpuštěných polysacharidů. Ztráta polysacharidů je způsobena především odštěpováním a hydrolytickými reakcemi. Právě odštěpování je výhodou při následující konverzi, ale protože jsou jako

produkty tvořeny také sloučeniny s nižší molekulovou hmotností, může docházet k degradaci a ztrátě uhlíku, a to ve formě oxidu uhličitého. [1]

Xylan může být selektivně odstraněn vodným roztokem hydroxidu draselného. Aby bylo zabráněno odštěpování koncových skupin, udržuje se při extrakci nízká teplota. Mohou být odštěpovány glukomanany a xylany. To samo o sobě není problémem, ale čím vyšší je frakce monomerní hemicelulózy, tím nižší je celkové obnovení hemicelulózy. Monomerní formy hemicelulózy jsou snadno rozložitelné na další (těkavé) látky, a to například na furfural, což poté vede ke ztrátám stravitelného substrátu pro jeho další využití. [1, 13]

Zbytková koncentrace zásady za spotřeby alkálie biomasou je koncentrace alkálie, která zbude po reakci. Alkalická extrakce může také způsobit rozpouštění, redistribuci a kondenzaci ligninu a modifikaci krystalického stavu celulózy. Tyto efekty mohou snížit nebo potlačit pozitivní účinky odstranění ligninu a zduření celulózy. Hydrolyzovatelnost zbývajících polysacharidů se po odstranění ligninu zvyšuje. [13]

Kyselá předúprava

Zředěné roztoky kyseliny sírové (4% hm.), chlorovodíkové a fosforečné jsou také využívány pro hydrolýzu biomasy. Tato úprava může být provedena se zředěnými nebo silnými kyselinami. Koncentrované kyseliny nejsou vhodné, protože jsou korozivní a také drahé. Díky zředěné kyselině se při hydrolýze hemicelulózy uvolní její monomerní jednotky, čímž se stane celulóza více dostupnou. Předúprava pomocí kyseliny může vyžadovat následnou neutralizaci hydrolyzátu alkáliemi. [4]

Předúpravy lignocelulózy s kyselinami při pokojové teplotě se provádí za účelem zvýšení možností anaerobního zpracování. Hlavní reakcí, která při předběžné úpravě kyselinou nastane, je hydrolýza hemicelulózy. Xylany a glukomannany jsou relativně stabilní. Solubilizované hemicelulózy (oligomery) mohou být podrobeny hydrolytickým reakcím, které v kyselém prostředí produkují monomery, furfural, HMF a další (těkavé) produkty. Lignin během této předúpravy rychle kondenzuje a sráží se. Solubilizace hemicelulózy a vysrážení rozpuštěného ligninu je výraznější při použití silné kyseliny ve srovnání se slabou kyselinou. [13]

Předúprava pomocí organických rozpouštědel

Alkoholy jsou nejčastěji používanými rozpouštědly pro běžná zpracování biomasy. Je-li lignocelulózová biomasa (zmenšených rozměrů) ‚vařena‘ v alkoholu při zvýšené teplotě, do horkého roztoku se rozpustí některé frakce hemicelulózy a ligninu. Kromě toho se v tomto horkém roztoku vyskytuje také kyselina octová, furfural, různé hexóзовé a pentóзовé cukry a lipofilní extrakty biomasy. Výsledný roztok je také zvaný jako černý roztok (lough) a je bohatý na lignin a hemicelulózy. Černý roztok je vypařován a kondenzován na obnovu alkoholového rozpouštědla. Následně se koncentrovaný černý roztok smísí s kyselou vodou, a to z důvodu vysrážení ligninu. Filtrací a destilací se pak oddělí furfural, extraktiva, kyselina octová a xylóza. [14]

Nově vyvinutou metodou je použití organického rozpouštědla (například methanol, kyselina octová nebo ethanol), a to kvůli jeho výhodné hodnotě Hildebrandovy rozpustnosti k hodnotě ligninu (lignin má hodnotu 11, kyselina octová 10,1 a kyselina mravenčí 12,1). K předúpravě

při mírné teplotě může být použita vysoká koncentrace **organické kyseliny** a katalyzátoru (H_2SO_4 nebo HCl). Po filtraci jsou pevné látky nebo celulózová buničina promyty čerstvým organickým rozpouštědlem. Černý roztok, který je bohatý na ligniny, je vypařen k oddělení recyklovatelného organického rozpouštědla a koncentrovaných zbytků. To je také kombinováno s promytím celulózové drtě vodou za účelem získání vysoce čistého ligninu. Tento proces se provádí při teplotách v rozmezí od 150 °C do 200 °C po dobu 2–5 hodin s kyselinou octovou, jejíž koncentrace je 75%–95%. [14]

2.3.3.4. Fyzikálně-chemická předúprava

V této kategorii je zahrnuta většina technologií pro předběžné úpravy. Patří sem úprava vodní parou (neboli parní exploze), předúprava v horké vodě, oxidační předúprava a předúprava ve vodném amoniaku. V poslední době jsou navrhovány iontové kapaliny a celulózové rozpouštědla na bázi frakcionace lignocelulózy. [4]

Během této úpravy je lignocelulózová biomasa zahřívána. Pokud teplota vzroste nad 150–180 °C, začnou se části lignocelulózové biomasy rozpouštět – nejdříve hemicelulózy a krátce na to také lignin. Složení hemicelulózového řetězce a větvící se skupiny stanovují teplotní, alkalickou a acidní stabilitu hemicelulózy. Ze dvou dominantních složek hemicelulóz (xylan a glukomanan), jsou xylany méně teplotně stabilní, ale rozdíl oproti glukomananům je pouze drobný. Během termálních procesů je část hemicelulóz hydrolyzována a tvoří kyselinu levulovou. U těchto kyselin se pak předpokládá, že katalyzují další hydrolýzu hemicelulózy. [1]

Tepelná předúprava s teplotami vyššími než 160 °C a více, způsobí kromě rozpouštění hemicelulózy také rozpouštění ligninu. Produkované sloučeniny jsou téměř vždy fenolové sloučeniny a mají v mnoha případech inhibiční nebo toxický efekt na bakterie, kvasinky a methanogeny/*Archae*. Tyto rozpustné ligninové sloučeniny jsou velmi reaktivní, a pokud nejsou rychle odstraněny tak rekondenzují a srážejí se na biomasu. Tepelné srážení, ve kterém vznikají (hemi)celulózové a ligninové sloučeniny, má riziko vzniku fenolických a heterocyklických sloučenin jako je vanilin, vanilin alkohol, furfural a hydroxymethylfurfural, a to zejména v kyselém prostředí. Takto vytvořené sloučeniny mohou mít inhibiční účinek. Například při zvýšení teploty na 220 °C byla výroba ethanolu téměř kompletně inhibována produkovaným furfurem. [1]

Předúprava vodní parou / parní exploze

Během této úpravy je biomasa po dobu několika minut ve velké nádobě, ve které jsou také páry o vysoké teplotě (teploty do 240 °C) a tlaku. Po uplynutí nastavené doby se pára uvolní a biomasa se rychle ochladí. Cílem parní předúpravy/parní exploze je rozpouštění hemicelulózy, aby byla celulóza lépe přístupná pro enzymatickou hydrolýzu, a aby se zabránilo tvorbě inhibitorů. [1]

Rozdíl mezi parní předúpravou a parní explozí je rychlé snižování tlaku a chlazení biomasy až na konci parní exploze, která způsobuje to, že voda v biomase „exploduje“. V předzpracování parou dochází k hydrolyzování částí hemicelulózy a vznikají kyseliny, které mohou katalyzovat další hydrolýzu hemicelulózy. Role kyselin je, pravděpodobně spíše než pro katalýzu rozkladu hemicelulózy, pro katalýzu hydrolýzy rozpustných hemicelulózových oligomerů. [15]

Předúprava horkou vodou

Jiná tepelná úprava je pomocí tekuté horké vody. V tomto případě je tekutá horká voda používána místo páry. Cílem vody je především rozpouštět hemicelulózy tak, aby byla celulóza lépe přístupná pro následnou hydrolýzu. Aby bylo zabráněno tvorbě inhibitorů, měla by být hodnota pH v rozmezí pH 4–7. Udržováním pH v tomto rozmezí se minimalizuje vznik monosacharidů a tím také tvorba degradačních produktů, které mohou dále katalyzovat hydrolýzu celulóзовého materiálu. Dojde-li ke katalytické degradaci cukrů, dojde k sérii reakcí, které je složité kontrolovat, a vedou ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů. Tím, že se udržuje pH v rozmezí pH 4–7, je této autokatalytické tvorbě inhibitorů fermentace zabráněno. [1, 15]

Amoniakální exploze

Tento způsob fyzikálně – chemického předčištění je proces, ve kterém je lignocelulóзовá biomasa vystavena roztoku NH_4OH při vysoké teplotě a tlaku po určitou dobu, poté se tlak náhle sníží. Tento proces je velmi podobný explozi vodní parou. V typickém procesu amoniakální exploze je dávkování kapalného amoniaku 1–2 kg amoniaku/kg suché biomasy, teplota je 90 °C a doba prodlevy je 30 minut. Tato předúprava může výrazně zlepšit rychlost fermentace různých bylinných plodin a trav. Také bývá používána pro předběžné zpracování mnoha lignocelulóзовých materiálů. Výsledkem pak je dekrystalizace celulózy, částečná polymerace hemicelulózy, odstranění acetylových skupin z hemicelulózy, štěpení lignino-karbohydrátových vazeb, zvýšení dostupné povrchové plochy v důsledku strukturálního narušení a zvýšená smáčivost ošetřené biomasy. [2]

2.3.3.5. Oxidační předúprava

Tato předúprava je založena na tom, že se do biomasy přidá oxidační sloučeniny, jako je například peroxid vodíku nebo kyselina peroctová. Cílem je odstranit hemicelulózu a lignin. Během oxidativní předúpravy probíhá několik reakcí, například elektrofilní substituce, přesunutí postranních řetězců, štěpení alkyl aryl etherových vazeb nebo oxidační štěpení aromatických jader. V mnoha případech není použité oxidační činidlo selektivní, a proto může dojít ke změnám hemicelulózy a celulózy. Také je přítomné vysoké riziko tvorby inhibitorů – oxidace ligninu a tvorba rozpustných aromatických sloučenin. Bylo prokázáno, že použití H_2O_2 pro delignifikaci je možné při maximálním pH 11,5. Pod pH 10,0 nedošlo k žádné podstatné delignifikaci a při pH 12,5 neměl peroxid vodíku žádný skutečný účinek na enzymatickou zpracovatelnost. Koncentrace peroxidu vodíku by měla být alespoň 1% a hmotnostní poměr mezi H_2O_2 a biomasou by měl pro dobrou delignifikaci být 0,25. Delignifikace je pravděpodobně způsobena hydroxylovým iontem, jež je produktem rozkladu peroxidu vodíku s maximem pH 11,5–11,6. Takto se rozpustí asi polovina ligninu (18–24 hodin, teplota 25 °C). [1]

2.4. Faktory ovlivňující hydrolýzu

Enzymatická i chemická hydrolýza lignocelulózy je ovlivňována několika faktory. Bylo dosaženo závěru, že krystalinita celulózy je jedním z hlavních faktorů. Další faktory jsou stupeň polymerizace, obsah vlhkosti, plocha povrchu a obsah ligninu. Uvádí se, že snížení velikosti částic má na zvýšení povrchu větší vliv než krystalinita na rychlost

a rozsah hydrolýzy. Jiní badatelé došli k závěru, že velikost pórů podkladu ve vztahu k velikosti enzymů je hlavním limitujícím faktorem enzymatické hydrolýzy lignocelulózové biomasy. Odstranění hemicelulózy zvětšuje střední velikost pórů podkladu a tím zvyšuje pravděpodobnost, že se celulóza také hydrolyzuje. Sušení předem zpracované lignocelulózy může způsobit problém ve struktuře pórů, což má za následek snížení (enzymatické) hydrostability. Celuláza může uváznout v pórech, pokud je vnitřní plocha mnohem větší než vnější plocha, což je běžné u mnoha lignocelulózových materiálů. Přítomnost ligninu omezuje rychlost a šíření (enzymatické) hydrolýzy, jelikož působí jako štít bránící té části substrátu, která je zpracovatelná a má být hydrolyzována. [1, 3]

2.5. Enzymatická hydrolýza lignocelulózové biomasy

Lignocelulóza může být rozložena na jednoduché cukry buď chemicky – pomocí kyseliny sírové nebo jiných kyselin a chemikálií, nebo enzymaticky – pomocí (hemi)celulotických enzymů. Enzymatická hydrolýza se začíná být vhodnějším způsobem, a to proto, že vyžaduje méně energie mírné podmínky prostředí, zatímco je produkováno méně inhibičních produktů. [16]

Biologická přeměna celulóзовé biomasy na paliva a chemikálie nabízí vysoké výnosy pro produkty, jež jsou důležité pro hospodářský úspěch a mají také potenciál pro velmi nízké náklady. Enzymatická hydrolýza, která převádí lignocelulózovou biomasu na zkvasitelné cukry, může být nejsložitějším krokem tohoto procesu. Ačkoliv enzymatická hydrolýza poskytuje potenciál pro vyšší výnosy, nižší náklady na energii a mírnější provozní podmínky než chemické procesy, není její mechanismus a vztah mezi strukturou a funkcí různých glykosylových hydroláz dobře znám. [20]

Mnoho organismů v přírodě, většinou bakterie a plísňe jsou schopny produkovat enzymy degradující biomasu. Celulotické mikroby mohou vyvíjet individuální nebo řetězové reakce v mikrobiálních společenstvech některých ekosystémů. Kombinace enzymů a mikrobu se liší u různých ekosystémů degradujících biomasu v závislosti na počátečním zdroji biomasy a na environmentálních faktorech. S novými biotechnologickými nástroji je zde potenciál pro rozvoj nových enzymových zdrojů, které poskytují lepší funkci enzymů, lepší tepelnou stabilitu, vyšší odolnost proti inhibitorům a lepší kombinace různých enzymů (např. celuláza, hemiceluláza, pektináza a proteináza), které pak maximalizují výnosy cukrů při nízkých nákladech. [17, 19]

Pochopení struktury a funkce lignocelulózových materiálů a jejich degradujících enzymů bude neocenitelné pro stanovení role předúpravy biomasy, její hydrolýzy a enzymů vhodných pro konverzi lignocelulózové biomasy a vytvoření vhodných strategií k dosažení vysokých výtěžků a to s nízkým množstvím použitých enzymů. Enzymatická hydrolýza je ovlivněna jak strukturálními vlastnostmi celulózy, tak i způsobem působení enzymů. Vzhledem ke složitosti celulóзовého substrátu a celulázového systému, nebyl mechanismus hydrolýzy celulóзовého substrátu stále zcela objasněn, i když bylo během posledního desetiletí získáno hodně poznatků o enzymech a jejich působení. [20]

2.5.1. Substrátové faktory

Kompletní struktura a kompozice ligninu, který váže celulózová vlákna spolu v kompozitní struktuře a snižuje přístupnost celulózy enzymům, stále ještě není zcela objasněna. K úplnému rozložení této heterogenní struktury ve stěně rostlinné buňky vyžaduje synergické reakce enzymů, ke kterým patří celulázy, hemicelulázy, přídavné enzymy a lignin modifikující enzymy. Naše současné znalosti ale k pochopení celého obrazu enzymatické hydrolýzy celulózové biomasy nestačí. [20]

2.5.2. Enzymové faktory

Enzymatická hydrolýza celulózy se typicky vyznačuje nerozpustnými reakčními složkami (celulózový substrát) a rozpustnými katalyzátory (enzymy). Je ovlivněna nejen strukturálními znaky pevného podkladu, ale taky enzymovými faktory, jako je například jeho zdroj, inhibice produktu, tepelná inaktivace, specifická aktivita, nespecifické vazby a kompatibilita enzymu. [20]

2.5.3. Enzymatická hydrolýza celulózy

Dle uvedených dat je pro celulázy optimální teplota 40–50 °C a pH 4–5, přičemž optimální teploty pro xylanázu jsou velmi podobné. Pro úplnou degradaci celulózy je nutné synergetické působení čtyř celulázových enzymů: endoglukanázy, celobiohydrolázy, exoglukohydrolázy a β – glukosidázy.

Endoglukanázy působí náhodně na vnitřní glykosidické vazby – v amorfní části celulózy, dojde k uvolnění oligosacharidů s vyššími polymeračními stupni.

Celobiohydrolázy degradují celulózu odstraněním molekul celobiózy. Mohou působit na krystalické části celulózy, kde působí na redukující a neredukující konce řetězců glukózy.

Exoglukohydrolázy jsou odpovědné za odstranění glukózových jednotek z neredukujících konců cyklodextrinů.

Poslední ze čtveřice enzymů, tedy β – glukosidázy hydrolyzují celobiosu na glukózu a také odstraňují glukózové jednotky z neredukujících konců malých celulodextrinů. [16]

2.5.4. Inhibitory enzymatické hydrolýzy lignocelulózových materiálů

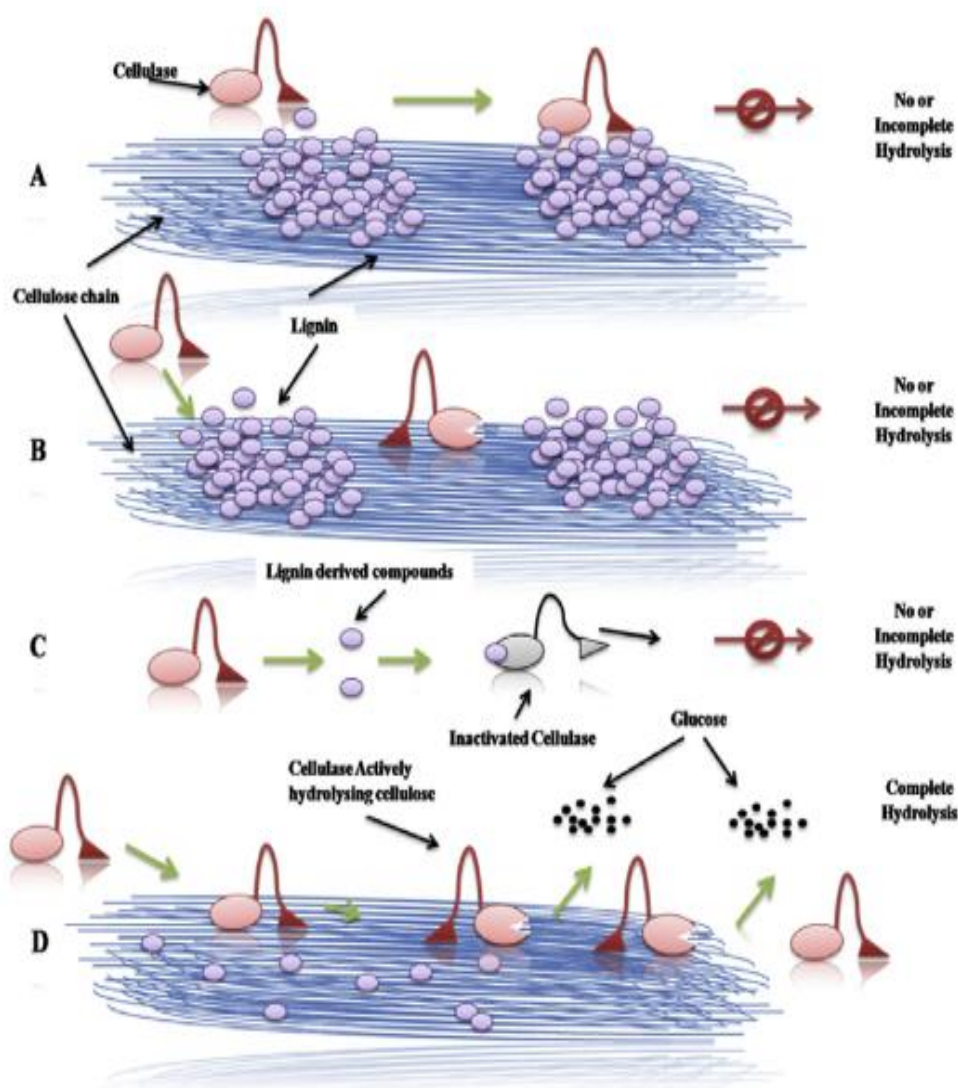
Většina inhibitorů se tvoří během předúpravy, kdy hemicelulózy a/nebo lignin jsou rozpuštěny a degradovány. Extrakty a celulóza, které jsou předběžnou úpravou neúmyslně ovlivněny, jsou jinými zdroji. Vzhledem k tomu je tvorba inhibičních látek závislá na způsobu předběžné úpravy. [9, 18]

2.5.4.1. Xylany

Bylo zjištěno, že hemicelulózy jsou fyzikální bariérou v hydrolýze celulózy a brání přístupu enzymů k povrchu celulózy. Kromě toho mohou rozpustné hemicelulózy silně inhibovat celulázovou aktivitu. Hemicelulózy, zejména xylany jsou ve tvrdém dřevě a v jednoletých rostlinách důležité v papírenství tím, že produkují požadované množství vláken a také mohou být použity pro modifikace celulózových vláken. Při zpracování lignocelulózového materiálu bylo prokázáno, že lignin a hemicelulózy jsou hlavními překážkami v enzymatické hydrolýze předem upravených materiálů. [19]

Inhibice celulázy

Xylany jsou k celulóze afinitní a mohou nezvratně absorbovat na celulózovém povrchu. Bylo zjištěno, že absorpce xylanu na povrchu celulózy je ovlivněna molekulární strukturou, a to například druhů substituentů xylanu, stupeň substituce a molekulovou hmotností. Hemicelulózy, a to buď ve svém původním umístění ve vláknech, nebo v důsledku solubilizace a následně možného přemístění na povrchu, mohou fyzicky zablokovat přístup k celulóze. Takto bylo zjištěno, že enzymatická hydrolýza je ovlivněna množstvím zbytkových xylanů po předúpravě těchto materiálů. I nízké množství xylanu může limitovat rozsah a rychlost hydrolýzy celulózy. Mnoha autory bylo popsáno, že pomocí doplnění xylanáz se v lignocelulózových materiálech obsahujících xylan jasně zvýší hydrolýza celulózy. [19]



Obrázek 10: Inhibice celulázy ligninem: a) Neproduktivní adsorpce celulázy na lignin; b) fyzikální blokáda celulázového pokroku na lignocelulózovém řetězci; c) inhibice v důsledku rozpustných sloučenin odvozených od ligninu; d) normální účinek celulázy na celulózový řetězec, kde dochází k uvolnění glukózy v přítomnosti žádného nebo velmi nízkého množství ligninu. [21]

2.5.4.2. Lignin

Ve stěně rostlinné buňky se obsah ligninu pohybuje od 2 do 40%. V těchto buňkách poskytuje lignin oporu lignocelulózové biomasy a tvoří štít pro sacharidy, což je pro enzymatickou hydrolýzu nežádoucí. V přírodě i v průmyslových procesech celulózy obvykle působí v prostředí, kde je lignin nedílnou součástí substrátu (lignocelulózy). V nativní lignocelulóze jsou celulózová vlákna uložena v síti hemicelulózy a ligninu, zatímco v předběžně upravených surovinách je tato síť narušena. [21]

Inhibice celulózy

Enzymatické zcukernatění v podstatě vyžaduje adsorpci celulózy na celulózu. Nicméně lignin, může po předúpravě (zředěnou kyselinou nebo parní explozí) narůst až na 40% a vytvořením fyzické bariéry inhibovat přístup enzymů k celulóze. Soutěží s celulózou o enzymy pomocí neproduktivní adsorpce a také pomocí deaktivace enzymů. Neproduktivní adsorpce enzymů na lignin bohaté složky v biomase je hlavní inhibiční mechanismus, který zabraňuje efektivní hydrolýze sacharidů buněčné stěny, zvláště v měkkých dřevinách. [21]

Možnosti inhibice celulózy ligninem lze rozdělit do několika skupin:

- 1) neproduktivní adsorpce celulózy na lignin;
- 2) fyzikální blokáda celulózy na lignocelulózovém řetězci;
- 3) inhibice v důsledku rozpustných sloučenin odvozených od ligninu. [21]

V provozních podmínkách omezují nevratnými vazbami enzymu na lignin pohyb enzymů, což je omezující pro degradaci nerozpustných polysacharidových substrátů. Studium role jakou má adsorpce ligninu na narušenou hydrolýzu lignocelulózy je náročné, neboť neexistují žádné přímé prostředky k rozlišení vazby enzymů celulózy na lignin. Enzymová inhibice v důsledku ligninu je poměrně složitá, protože obsah ligninu nemusí nutně znamenat špatnou enzymatickou štěpitelnost. [21, 22]

Měkké dřevo bývá nazýváno jako nejhorší možný substrát pro biokonverzní procesy, a to vzhledem k nízkým výtěžkům hydrolýzy, jež jsou získány s enzymovým dávkováním adekvátním pro jiné suroviny. Malá degradace sacharidů byla aspoň částečně připisována ligninu přítomnému v měkkém dřevě, a to proto, že metoda delignifikace par rozloženého dřeva, jež prokázala výrazné zvýšení výtěžků hydrolýzy. Inhibiční účinek ligninu na hydrolýzu měkkého, tvrdé dřevo a trávy byl zkoumán při hydrolýze mikrokrytalické struktury celulózy. Bylo zjištěno, že zbytky po hydrolýze bohaté na lignin měly silnější inhibiční účinek na hydrolýzu než ligniny z jiných zdrojů. V důsledku toho se zdá být inhibiční účinek ligninu hlavním problémem při využívání měkkých dřevin pro enzymatickou hydrolýzu. [22]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Mikrobiální kmeny, chemikálie a přístrojové vybavení

3.1.1. Použité mikrobiální kmeny

V experimentální části byly použity bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně a *Burkholderia sacchari* DSM 17165 z Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

3.1.2. Použité komerčně dostupné enzymy

Viscozyme L celullotic enzyme mixture (Sigma Aldrich)
endo – 1, 4 – β – xyllanase from *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma Aldrich)
Cellulase from *Trichoderma reesei* TCC 26921(Sigma Aldrich)
Hemicellulase from *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich)

3.1.3. Použité chemikálie

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (ČR)
Dodecylsírán sodný (SDS), TCI CO (Japan)
Ethanol (96%) p.a., Merci (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát, Lach-Ner (ČR)
Fosforečnan sodný dihydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-Ner
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová, Lach-Ner (ČR)
Peroxid vodíku, Lach-Ner (ČR)
Kyselina sírová (96%) p.a., Lach-Ner (ČR)
Molybdenan amonný tetrahydrát p.a., Lachema (ČR)
Sírán amonný p.a., Lach-Ner (ČR)
Sírán hořečnatý heptahydrát, Lach-Ner (ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Lach-Ner (ČR)
Uhličitan sodný p.a., Lachema (ČR)
Vinan sodno-draselný p.a., Lachema (ČR)
Chloroform, Lach-Ner (ČR)
Kyselina dinitrosalicylová, Sigma Aldrich
Kyselina gallová, Sigma Aldrich
Folin-Ciocalteovo činidlo, WVR Chemicals, BDH Prolabo
Kyselina octová, Lach - Ner (ČR)
Amoniak, Lach-Ner (ČR)
Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (12% 3HV), Fluka

3.1.4. Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf:
Trace GC Ultra FID detector, Finnigan, Thermo
Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm pro stanovení

pH metr Sensodirect 200, Lovibond
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
Nanophotometr Pearl, Implen
Předvážky EW 620, Kern
Analytické váhy BAS 31, Boeco Germany
Centrifuga U-32R, Boeco Germany
Vortex TK3S, techno Kartell
Magnetická míchačka, techno Kartell
Termostat blokový SBH-200D, Stuart
Vodní lázeň TW2, Julabo
Biologický inkubátor IP100-U, Scientific
Třepačka Helidolphunimax 1000, inkubátor Helidolphunimax 1010, Labcom s.r.o.
Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2. Použité metody

3.2.1. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové

3.2.1.1. Příprava roztoku kyseliny 3,5 – dinitrosalicylové

Nejdříve byly naváženy 2,0 g kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové. Při zahřívání byla kyselina rozpouštěna ve 100 ml destilované vody a následně bylo přidáno 40 ml roztoku 2 M NaOH. K jeho přípravě bylo naváženo 8 g pevného NaOH, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Následně bylo naváženo 60 g vinanu sodno-draselného, který se přidal do roztoku a objem roztoku byl doplněn destilovanou vodou tak, aby byl celkový objem připraveného roztoku kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové 200 ml.

3.2.1.2. Postup pro stanovení

Do zkumavek bylo pipetováno 0,1 ml vzorku, 0,4 ml destilované vody a také 0,5 ml činidla 3, 5 – dinitrosalicylové kyseliny. Poté byly vzorky zahřívány na vodní lázni při 70 °C po dobu 10 minut. Dále byly vzorky ponechány ve tmě, aby zchladly. Následně byly všechny zkumavky doplněny destilovanou vodou na objem 10 ml a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly analyzovány pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm. Slepý vzorek byl současně připravován s ostatními vzorky, kde bylo pipetováno 0,5 ml činidla. Po vyjmutí z vodní lázně (70 °C po dobu 10 minut) a následném vychladnutí byly roztoky doplněny na objem 10,0 ml. Bylo tedy přidáno 9,0 ml destilované vody. Pomocí rovnice kalibrační křivky sestrojené pro dané koncentrace glukózy bylo vypočítáno množství celkových sacharidů ve vzorku.

Každý vzorek byl analyzován čtyřikrát, byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka z naměřených dat pomocí software Microsoft Office Excel.

3.2.1.3. Kalibrační křivka

Pro stanovení kalibrační křivky byl připraven roztok glukózy o koncentraci 5 g/dm³. Do připravených zkumavek bylo poté odpipetováno 3,0; 2,7; 2,4; 2,1; 1,8; 1,5; 1,2; 0,9; 0,6; 0,3; 0,1 ml tohoto roztoku. Zkumavky byly doplněny na objem 3 ml destilovanou vodou.

Dále bylo odpipetováno 0,5 ml těchto připravených roztoků a k nim přidáno 0,5 ml činidla kyseliny 3, 5 - dinitrosalicylové. Zkumavky byly umístěny na 10 minut do vodní lázně, která měla teplotu 70 ° C. Poté byly ponechány ve tmě zchladnout a doplněny destilovanou vodou na 10 ml. Nakonec byla změřena absorbance spektrofotometricky, a to při 540 nm.

3.2.2. Stanovení polyfenolů pomocí Folin – Ciocalteova činidla

3.2.2.1. Postup pro stanovení

Při reakci Folin-Ciocalteova činidla vzniká modrý komplex. Do zkumavky byl přidán 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté byl k roztoku přidán 1 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃. Po 15 minutách byla změřena absorbance při 750 nm. Každý vzorek byl analyzován dvakrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel. Koncentrace polyfenolů ve vzorcích byla vypočítána z rovnice grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým byla kyselina gallová.

3.2.2.2. Kalibrační křivka

Na analytických vahách bylo naváženo 0,05 g kyseliny gallové. Navážka byla rozpuštěna a převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po značku. Do odměrných baněk o objemu 10,0 ml bylo napipetováno 0,15; 0,20; 0,25; 0,40; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 a 2,0 ml připraveného roztoku kyseliny gallové a baňky byly doplněny destilovanou vodou po značku. Takto byla vytvořena kalibrační řada roztoků. Do zkumavky byl přidán 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Obsah zkumavek byl promíchán a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃. Po 15 minutách byla změřena absorbance vzorků při 750 nm.

3.2.3. Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie (GC)

Principem této metody je pomocí esterifikace převést polyhydroxyalkanoáty na těkavé methylester- β – hydroxykarboxylové kyseliny, jež jsou kysele katzované.

3.2.3.1. Stanovení kalibrační křivky PHA

Do vialek byl pipetován roztok komerčně dostupného PHA: standard P(3HB-co-3HV) o koncentraci 10 mg/ml. Pipetován byl takto: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml. Vzorky byly poté doplněny chloroformem tak, aby byl výsledný objem 1 ml. Poté bylo přidáno 0,8 ml 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly uzavřeny víčkem a umístěny na 3 hodiny do termobloku na 90 °C. Po vychladnutí bylo k celkovému objemu vialek přidáno 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Roztoky se protřepaly a došlo k oddělení fází. Z každého vzorku bylo pipetováno 0,05 ml spodní chloroformové fáze, jež byla poté převedena do vialek. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,95 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie.

3.2.3.2. Stanovení PHA v biomase

Do větších vialek bylo naváženo přibližně 10 mg biomasy. Následně byl k biomase přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly poté umístěny do termobloku o teplotě 90 °C na dobu 3 hodin. Po ochlazení byl obsah vialek

převeden do dalších vialek. K vzorkům bylo přidáno 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Roztoky byly protřepány, a tak došlo k oddělení fází. Ze spodní chloroformové fáze bylo pipetováno 0,05 ml a ke každému vzorku bylo přidáno 0,95 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a následně analyzovány pomocí plynové chromatografie.

3.3. Metody předúpravy a enzymatická hydrolýza

K enzymatické hydrolýze byly použity tyto enzymy: viscozyme, celulóza, hemicelulóza a xylanáza.

V následující tabulce jsou zobrazeny hodnoty pH a teploty, které jsou optimální pro kultivaci roztoků obsahujících dané enzymy (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Enzymatická hydrolýza

Enzym	pH optimum	T [°C]
Viscozyme	3,5	55
Celulóza	5,0	37
Hemicelulóza	5,5	37
Xylanáza	4,5	30

3.3.1. Chemická předúprava

3.3.1.1. Hydrolýza kyselinou (H_2SO_4)

Tento způsob předúpravy využívá hydrolýzy pilin v málo koncentrovaných roztocích kyselin. K tomuto účelu byla vybrána kyselina sírová. Koncentrace této kyseliny v roztoku byla 2 %.

Roztoky obsahovaly 50 g/dm³ pilin. Hydrolýza byla provedena v Erlenmeyerových baňkách, které byly se vzorky obsahujícími piliny umístěny do autoklávu po dobu 60 minut. Poté byly roztoky ochlazeny na laboratorní teplotu. K získání čirého roztoku byla použita filtrace za sníženého tlaku. U roztoku bylo pH upraveno na hodnotu pH 6,5 pomocí koncentrovaného roztoku NaOH.

Následně byla u vzorků pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové stanovena koncentrace redukujících sacharidů a pomocí Folin-Ciocalteova činidla koncentrace polyfenolů.

Tyto roztoky byly zaočkovány enzymy a umístěny na třepačku, kde probíhala jejich kultivace. Kultivace trvala 24 hodin a teplota, při které byly vzorky kultivovány, byla 37 °C.

Enzymatická hydrolýza

Tyto roztoky byly následně zaočkovány enzymy a umístěny na třepačku, kde probíhala jejich kultivace. Kultivace trvala 24 hodin a teplota, při které byly vzorky kultivovány, byla 37 °C.

Po ukončení inkubace byla v roztocích stanovena pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové koncentrace redukujících sacharidů a koncentrace polyfenolů byla stanovena pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

3.3.1.2. Kombinace: předúprava kyselinou a sonifikace

Tato metoda předúpravy kombinuje předúpravu pomocí hydrolýzy ve zředěné kyselině sírové a pomocí sonifikace. Byly připraveny dva vzorky:

První vzorek byl připraven tak, že byly piliny v koncentraci 50 g/dm^3 dány do destilované vody. Tento roztok byl sonifikován. Následně do něj byla přidána kyselina sírová.

Druhý vzorek byl připraven tak, že bylo do roztoku 2 % H_2SO_4 přidáno dané množství pilin tak, aby odpovídalo koncentraci 50 g pilin na 1 dm^3 roztoku. Tento roztok byl poté sonifikován.

Oba dva roztoky byly poté umístěny na 1 hodinu do autoklávu. Poté byly roztoky ochlazeny na laboratorní teplotu a pomocí koncentrovaného roztoku NaOH bylo jejich pH upraveno na hodnotu pH 6,5. U těchto roztoků byla poté stanovena koncentrace redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3,5 – dinitrosalicylové a pomocí Folin – Ciocalteova činidla koncentrace polyfenolů.

3.3.1.3. Alkalická předúprava (NaOH)

K této metodě předúpravy bylo využito luhování pilin v roztoku NaOH.

Byly připraveny 3 roztoky NaOH o koncentraci 2 %, 5 % a 8 %. Do každého roztoku byly přidány piliny v koncentraci 50 g/dm^3 . Piliny se v těchto roztocích po dobu 2 hodin luhovaly. Roztok byl následně filtrován za sníženého tlaku a vyluhované piliny byly vysušeny v sušárně při teplotě 75°C . Takto vysušené piliny byly poté použity ke kyselé hydrolýze pomocí 2 % H_2SO_4 . Baňky s roztoky byly umístěny na 1 hodinu do autoklávu, po ochlazení byly zfiltróvány za sníženého tlaku.

Tak byly získány tři roztoky, které byly následně pomocí koncentrovaného roztoku NaOH neutralizovány na pH 6,5. Tyto roztoky byly použity pro stanovení redukujících cukrů pomocí 3,5 - dinitrosalicylové kyseliny a pro stanovení polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

Enzymatická hydrolýza

U takto připravených roztoků provedena také enzymatická hydrolýza. To znamená, že do roztoků, které vznikly luhováním pilin v NaOH o koncentraci 2 %, 5 % a 8 % a následnou kyselou hydrolýzou v 2 % H_2SO_4 , byly přidány enzymy: viscozyme, hemiceluláza, xyláza a kombinací enzymů hemiceluláza a viscozyme.

Do každého roztoku o pH 6,5 bylo přidáno dané množství enzymu. Následně probíhala kultivace na třepačce při 37°C . Po 24 hodinové kultivaci bylo u jednotlivých roztoků stanoveno množství redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3,5 – dinitrosalicylové a koncentrace polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

3.3.1.4. Předúprava pomocí organických rozpouštědel – kyselina octová, ethanol

V této metodě byla vybrána dvě organická rozpouštědla, a to kyselina octová a ethanol.

Byly připraveny 2 roztoky, ve kterých byla kyselina octová. První roztok obsahoval 80 % kyselinu octovou, jeho objem byl 100 ml, tudíž obsahoval 5 g pilin (tj. koncentrace 50 g/dm^3). Druhý roztok obsahoval 80 % kyselinu octovou a navíc 4 % H_2SO_4 . Baňky s roztoky byly umístěny na 1 hodinu do autoklávu (121°C , při uzavřeném ventilu), po ochlazení byly filtrovány za sníženého tlaku. Tak byly získány dva roztoky, které byly následně pomocí koncentrovaného roztoku NaOH neutralizovány na pH 4,5.

Také byla použita metoda předúpravy pomocí luhování v ethanolu. K tomuto byl použit denaturovaný líh, 5 g pilin bylo po dobu 2 h luhováno v 100 ml denaturovaného líhu. Poté byly piliny filtrovány za sníženého tlaku a umístěny do sušárny. Tyto vysušené piliny byly poté hydrolyzovány. Bylo připraveno 100 ml roztoku 2 % H_2SO_4 , do kterého bylo přidáno 5 g

těchto pilin. Baňka s roztokem byla umístěna na 1 hodinu do autoklávu a po ochlazení byl roztok filtrován za sníženého tlaku. Tento roztok byl následně upraven pomocí koncentrovaného roztoku NaOH na pH 6,5.

Všechny připravené roztoky byly použity pro následné stanovení redukujících cukrů pomocí 3,5 – dinitrosalicylové kyseliny a pro stanovení polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

Enzymatická hydrolýza

Následně byla u roztoků, které byly takto připraveny, provedena enzymatická hydrolýza. Do každého roztoku o pH 4,5 (pH 6,5 v pro luhování v ethanolu) bylo přidáno dané množství enzymu (viz tabulka). Následně probíhala inkubace na třepačce při 37°C. Vzorke 13–16 jsou vzorky, jež byly připraveny kyselou hydrolýzou surových, předem neupravených pilin. Následně probíhala inkubace na třepačce při 37 °C. Po skončení inkubace, která trvala 24 hodin, bylo u těchto roztoků zjištěno množství redukujících cukrů a také množství celkových polyfenolů.

3.3.2. Fyzikálně-chemická předúprava - Tepelná předúprava

3.3.2.1. Amoniakální exploze

K tomuto způsobu předúpravy byl použit 5 % roztok NH_4OH a 15 % roztok NH_4OH . Koncentrace pilin v roztocích byla 50 g/dm^3 .

Piliny byly hydrolyzovány v Erlenmeyerových baňkách. Hydrolýza pak probíhala v roztocích amoniaku anebo v roztocích, ve kterých byla směs amoniaku a kyseliny sírové. Vzorky byly umístěny do autoklávu, kde byly po dobu 60 minut zahřívány při teplotě 121 °C. Následně byly ochlazeny na laboratorní teplotu a filtrovány za sníženého tlaku. Pomocí koncentrovaného roztoku NaOH byly zneutralizovány na pH 6,5.

V získaných hydrolyzátech byl stanoven obsah redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3,5 - dinitrosalicylové a také byl stanoven obsah polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

Vzorky byly připraveny dle následující tabulky.

Tabulka 2: Amoniakální předúprava - vzorky

vzorek	obsah NH_3 (%)	obsah H_2SO_4 (%)
1	5	-
2	5	2
3	15	-
4	15	2

3.3.2.2. Exploze vodní parou

1. měření

Při této metodě předúpravy byly piliny podrobeny explozi vodní parou. To znamená, že bylo dané množství pilin vystaveno horké vodní páře po dobu 1 hodiny. K tomuto způsobu byl využit autokláv. Následně byly piliny vysušeny v sušárně při 75 °C do konstantní hmotnosti. Tyto piliny byly poté hydrolyzovány pomocí roztoku 2 % H_2SO_4 , kde byla koncentrace pilin

v roztoku 50 g/dm^3 . Poté byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a filtrován za sníženého tlaku.

U toho roztoku bylo pH upraveno přibližně na hodnotu pH 6,5 a následně u něj bylo stanoven obsah redukujících sacharidů a obsah polyfenolů stejně jako v u amoniakální exploze.

Enzymatická hydrolýza

Dané materiály byly hydrolyzovány jednotlivými enzymy.

Tabulka 14 zobrazuje, při jakých podmínkách probíhala jejich inkubace. Baňky, ve kterých byly hydrolyzáty zaočkovány enzymy, byly umístěny na třepačku, kde probíhala jejich, která trvala 24 hodin. U každého z těchto roztoků poté byla stanovena koncentrace redukujících cukrů a koncentrace polyfenolů.

2. měření – optimalizace pH

Piliny byly přidány do roztoku, který obsahoval 2 % H_2SO_4 . Tento roztok byl v Erlenmeyrově baňce a byl umístěn na jednu hodinu do autoklávu. Poté byl roztok ochlazen a rozdělen na pět dílů a jejich pH bylo pomocí koncentrovaného roztoku NaOH upraveno podle hodnot pH optimum jednotlivých enzymů:

viscozyme – pH 3,5

xyláza – pH 4,5

celuláza – pH 5,0

hemiceluláza – pH 5,5

U těchto roztoků byla poté stanovena pomocí kyseliny 3, 5 - dinitrosalicylové koncentrace redukujících cukrů a pomocí Folin- Ciocalteova činidla u nich byla stanovena koncentrace polyfenolů.

Enzymatická hydrolýza

Následně byla u takto připravených roztoků provedena enzymatická hydrolýza. Tato enzymatická hydrolýza byla provedena za účelem výběru kombinace enzymů, která má nejvyšší výtěžky redukujících sacharidů a nejmenší množství polyfenolů.

Byly vybrány tři různé roztoky z předchozí kapitoly, jejichž pH vybráno podle hodnot pH optimum (pH bylo zvoleno jako kompromis jednotlivých pH optimum vybraných enzymů – pH 3,5; pH 4,5; pH 5,5).

Takto připravené roztoky byly poté zaočkovány vybranými enzymy. Všechny vzorky byly poté kultivovány po dobu 24 hodin na třepačce při 37°C .

Po skončení kultivace u nich bylo stanoveno množství redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové a pomocí Folin-Ciocalteova činidla u nich byla stanovena koncentrace polyfenolů.

3.3.2.3. Oxidační předúprava (H_2O_2)

V této metodě byl použit roztok peroxidu vodíku. Piliny byly v peroxidu vodíku luhovány, jejich koncentrace byla v roztoku 50 g/dm^3 .

Byly připraveny 3 roztoky H_2O_2 , jejichž objem byl 100 ml a měly koncentraci H_2O_2 2 %, 5 % a 8 %.

Do každého bylo přidáno 10 g pilin a ty se v nich po dobu 2 hodin luhovaly. Roztok byl následně filtrován za sníženého tlaku a vyluhované piliny byly vysušeny při teplotě 75°C .

Tyto piliny byly poté použity ke kyselé hydrolýze pomocí 2 % H_2SO_4 . Baňky s roztoky byly umístěny na 60 minut do autoklávu a po ochlazení byly zfiltrovány.

Tak byly získány tři roztoky, které byly následně pomocí koncentrovaného roztoku NaOH neutralizovány na pH 6,5. Tyto roztoky byly použity pro stanovení redukujících cukrů pomocí 3, 5 – dinitrosalicylové kyseliny a pro stanovení polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

Enzymatická hydrolýza

U takto připravených roztoků byla následně provedena enzymatická hydrolýza. Do každého roztoku o pH 6,5 bylo přidáno dané množství enzymu. Následně probíhala inkubace na třepačce při 37 °C. Po skončení inkubace, která trvala 24 hodin, bylo u těchto roztoků zjištěno množství redukujících cukrů a také množství celkových polyfenolů.

3.3.3. Optimalizace metod: luhování v NaOH, H_2O_2 a ethanol

Optimalizace byla provedena pro dobu luhování pilin u již dříve použitých látek, a to: NaOH, H_2O_2 a ethanol. K tomu byly vybrány koncentrace látek, ve kterých byla hydrolýza nejúčinnější.

Hydroxid sodný byl použit jako 5 % roztok a peroxid vodíku jako 2 % roztok. Ethanol, který byl k tomuto měření použit, byl ethanol o koncentraci 96 %.

Doba, po kterou se piliny luhovaly ve vybraných roztocích byla 30 minut, 60 minut nebo 120 minut.

Po vyluhování byly piliny vysušeny v sušárně, ve které bylo 75 °C. Tyto piliny pak byly použity ke kyselé hydrolýze v 2% H_2SO_4 . Erlenmeyrové baňky s roztoky a pilinami v koncentraci 50 g/dm³ byly umístěny do autoklávu na 1 hodinu. Poté byly roztoky ochlazeny na laboratorní teplotu a za sníženého tlaku zfiltrovány. Po filtraci bylo pomocí koncentrovaného roztoku NaOH upraveno pH vzorků na pH 6,5.

U roztoků, které byly tímto způsobem získány byla stanovena koncentrace redukujících sacharidů pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové a celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

Enzymatická hydrolýza

Tyto roztoky byly zaočkovány enzymy a umístěny na třepačku, kde probíhala jejich kultivace. Kultivace trvala 24 hodin a teplota, při které byly vzorky kultivovány, byla 37 °C.

Po ukončení kultivace byla v roztocích stanovena pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové koncentrace redukujících sacharidů a koncentrace polyfenolů byla stanovena pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

3.3.4. Kultivace bakterií *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia*

3.3.4.1. Příprava inokula

Pro kultivaci inokula bakterií *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* bylo v Erlenmeyrových baňkách o objemu 100 ml připraveno živné médium o objemu 50 ml. Připravená média byla po dobu 60 minut sterilována v tlakovém hrnci po dobu 60 minut. Po vysterilizování a následném ochlazení roztoků na laboratorní teplotu, byly ve sterilním laminárním očkovacím boxe do Erlenmeyrových baněk pomocí bakteriologické kličky zaočkovány roztoky bakterií *Burkholderia cepacia* z agarové půdy. Bakterií *Burkholderia sacchari* byly naočkovány pomocí jejich tekutého roztoku, který byl předtím uchován

v tekutém dusíku při teplotě 70 °C. Takto připravená inokula byla kultivována po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C na třepáčkách.

3.3.4.2. Živné médium

Na přípravu inokul pro oba druhy bakterií bylo připraveno živné médium Nutrient Broth, a to tak, že ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 5 g komerčně dostupného Nutrient Broth. To poté bylo rozděleno na dva díly, každá pro jednu bakterii.

Složení živného média:

Beef extract	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
destilovaná voda	1000 ml

3.3.4.3. Zaočkování bakterií

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml bylo přelito 25 ml minerálního média a 25 ml daného hydrolyzátu.

Složení produkčního minerálního média pro *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* bylo:

(NH ₄)SO ₄	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9,02 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
NH ₄ -Fe(III) citrát	0,06 g
destilovaná voda	500 ml

Erlenmeyrové baňky, ve kterých bylo připraveno médium, byly umístěny do autoklávu, ve kterém byly po dobu 60 minut sterilovány.

Připravená inokula byla přeočkována do minerálního média. Po sterilizaci a ochlazení médií na laboratorní teplotu bylo v laminárním boxu do média pipetováno 50 µl roztoku TES a poté 5 ml inokula bakterie *Burkholderia cepacia*. Stejný proces byl proveden i pro bakterii *Burkholderia sacchari*. Připravené kultury byly umístěny na třepáčku, kde byly při teplotě 30 °C kultivovány po dobu 72 hodin.

3.3.4.4. Stanovení biomasy

Toto stanovení bylo provedeno gravimetricky. Z každé Erlenmeyrové baňky bylo po dokončení kultivace do centrifugačních zkumavek odebráno 10 ml suspenze buněk. Následná centrifugace byla provedena při 8000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a uschován pro další analýzy. Poté byla biomasa rozsuspendována v 5 ml destilované vody a následně byla opět centrifugována při 8000 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl vylit do odpadu a biomasa byla vysušena v termostatu při 70 °C do konstantní hmotnosti.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

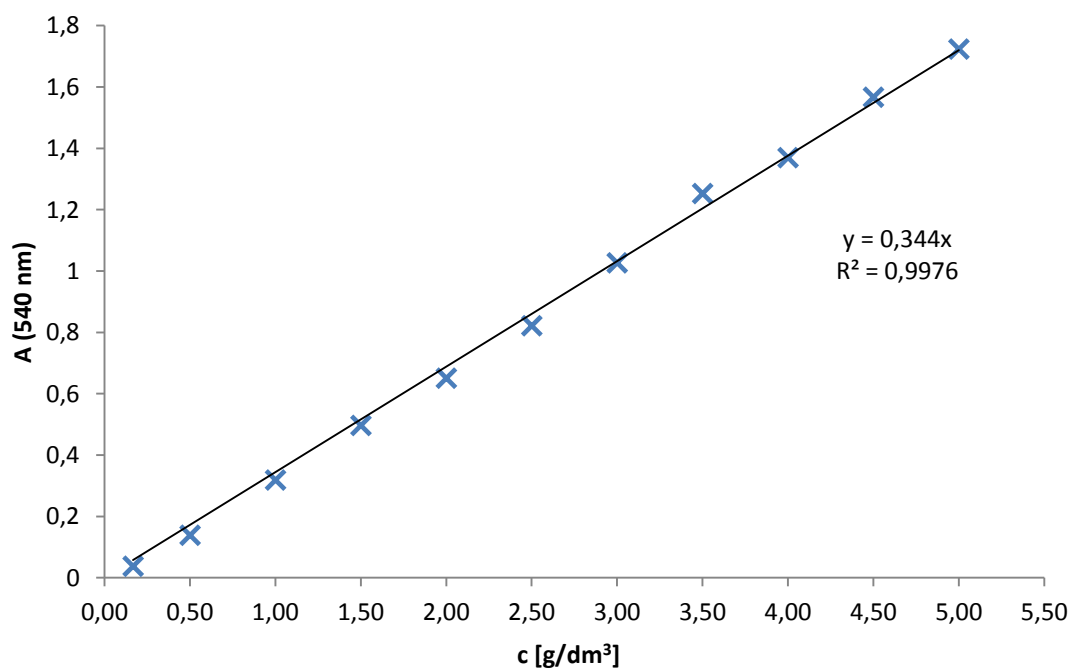
4.1. Kalibrace metod

4.1.1. Stanovení redukujících cukrů pomocí kyseliny 3, 5 – dinitrosalicylové

Data pro stanovení kalibrační závislosti byla získána spektrofotometricky. Při 540 nm byly změřeny roztoky glukózy o různých koncentracích dle postupu v kapitole 3.2.1.

Tabulka 3: Kalibrační křivka – stanovení redukujících sacharidů

c [g/dm ³]	A
0,17	0,038
0,50	0,139
1,00	0,319
1,50	0,497
2,00	0,651
2,50	0,822
3,00	1,027
3,50	1,253
4,00	1,37
4,50	1,567
5,00	1,724



Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení redukujících sacharidů

Na základě závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační přímka, jejíž rovnice je: $y = 0,344 x$.

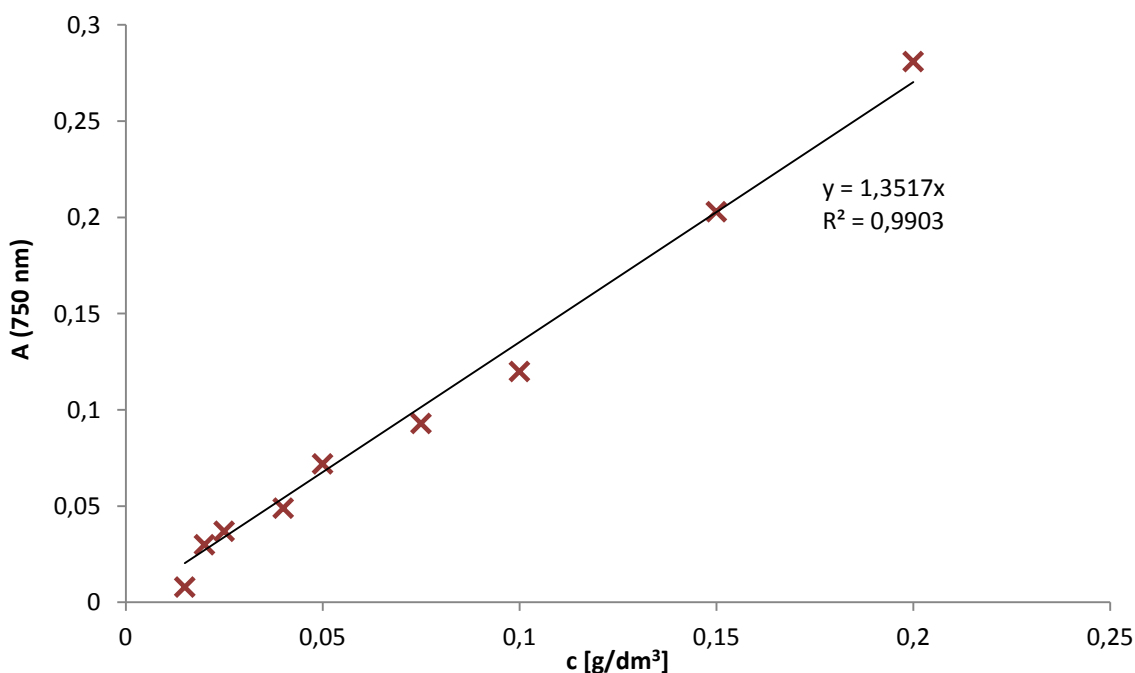
Tato rovnice byla následně použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů.

4.1.2. Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin – Ciocalteova činidla

Data pro sestavení kalibrační křivky byla stanovena pomocí spektrofotometrického měření při 750 nm. Podle postupu v kapitole 3.2.2 byly změřeny absorbance pro různě koncentrované roztoky obsahující kyselinu gallovou.

Tabulka 4: Kalibrační křivka – stanovení polyfenolů

c [g/dm ³]	A
0,015	0,008
0,02	0,030
0,025	0,037
0,040	0,049
0,050	0,072
0,075	0,093
0,100	0,120
0,150	0,203
0,200	0,281



Graf 2: Kalibrační křivka pro stanovení polyfenolů

Na základě závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační přímka, jejíž rovnice je: $y = 1,3517x$.

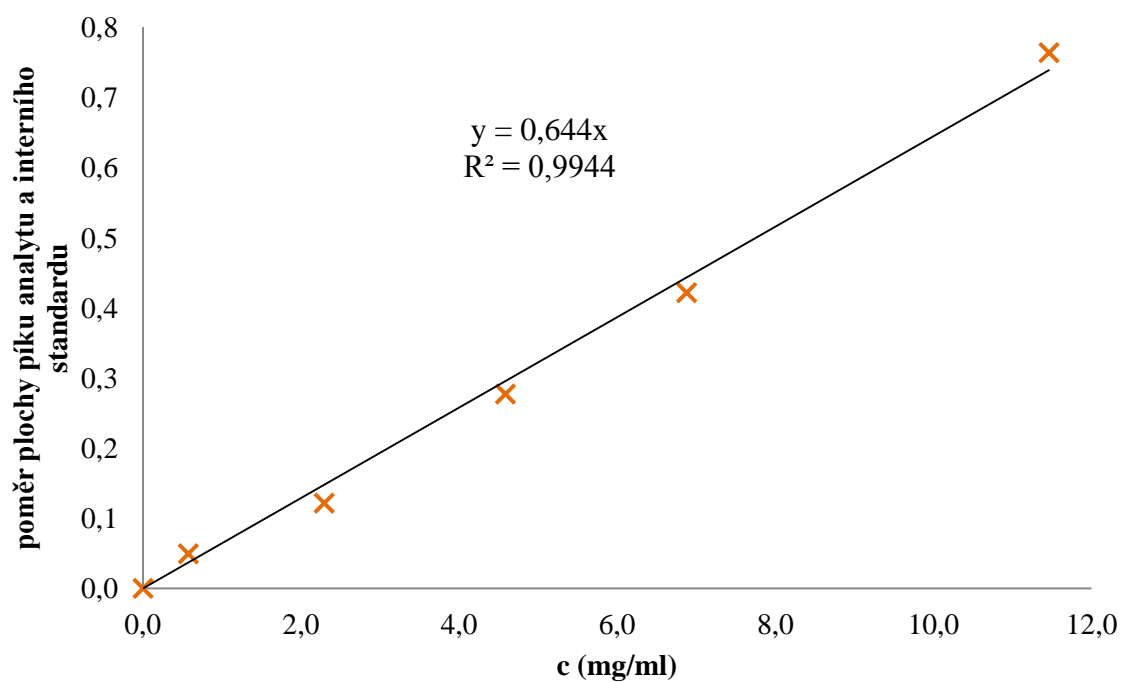
Tato rovnice byla následně použita pro stanovení koncentrace celkových polyfenolů.

4.1.3. Stanovení obsahu P(3HB) v biomase pomocí plynové chromatografie

Kalibrační křivka byla sestavena pro následné kvantitativní stanovení P(3HB). Jedná se o závislost poměru plochy píku analytu na interního standardu na koncentraci P(3HB).

Tabulka 5: Stanovení obsahu P(3HB) v biomase

koncentrace 3HB c (mg/ml)	poměr plochy píku analytu a interního standardu
0,000	0,0000
0,573	0,0493
2,292	0,1215
4,585	0,2770
6,877	0,4215
11,462	0,7636



Graf 3: Kalibrační křivka

Ze závislosti poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB byla stanovena kalibrační závislost $y = 0,644x$.

4.2. Metody předúpravy (chemická hydrolýza)

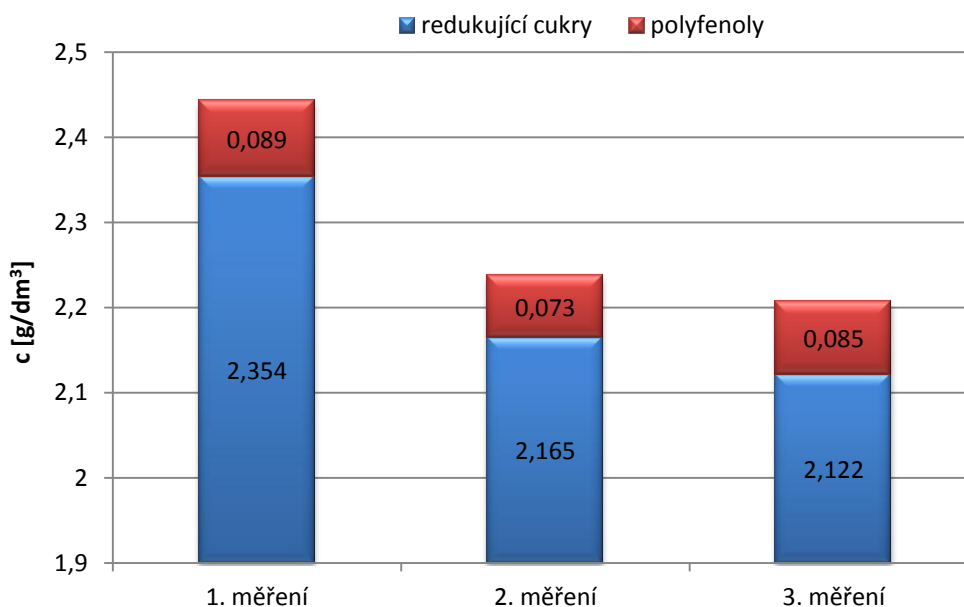
4.2.1. Hydrolýza kyselinou (H_2SO_4)

Chemická hydrolýza

V tomto experimentu byl testován vliv minerální kyseliny na účinnost hydrolýzy pro nijak neupravenou dřevní biomasu. K tomuto experimentu byla použita 2 % kyselina sírová, která primárně hydrolyzuje hemicelulózy použitých materiálů – proto je tento hydrolytický krok možné považovat také za předúpravu materiálu před enzymatickou hydrolýzou celulózy. Tato hydrolýza byla provedena 3krát a následně z nich byla ze získaných dat vypočítána průměrná hodnota.

Tabulka 6: Výsledky - kyselá předúprava

předúprava kyselinou (H_2SO_4)	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
1. měření	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$
2. měření	$2,165 \pm 0,073$	$73,9 \pm 1,5$
3. měření	$2,122 \pm 0,075$	$85,4 \pm 1,1$



Graf 4: Předúprava kyselinou (H_2SO_4)

Tento experiment byl proveden na třech vzorcích, které byly připraveny stejným způsobem. Průměrná koncentrace redukujících cukrů byla stanovena na $2,354 \pm 0,038 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro obsah polyfenolů ve vzorcích byla průměrná hodnota koncentrace $89,0 \pm 1,9 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (viz Tabulka 6). Celkově lze konstatovat, že výtěžky redukujících sacharidů jsou relativně nízké a využití hydrolyzátů připravených pouze pomocí kyselé hydrolýzy by bylo velice problematické. Na druhou stranu se zdá, že kyselá hydrolýza vede k nízkému stupni rozrušení ligninu a extrakci polyfenolů. Tato skutečnost může být pozitivní, protože polyfenoly jsou významnými mikrobiálními inhibitory. Nicméně tato skutečnost může mít také negativní

aspekt – je možné, že samotná kyselá hydrolýza nenaruší dostatečně strukturu ligninu, což bude následně snižovat efektivitu enzymatické hydrolýzy.

4.2.2. Kombinace: předúprava kyselinou a sonifikace

Chemická hydrolýza

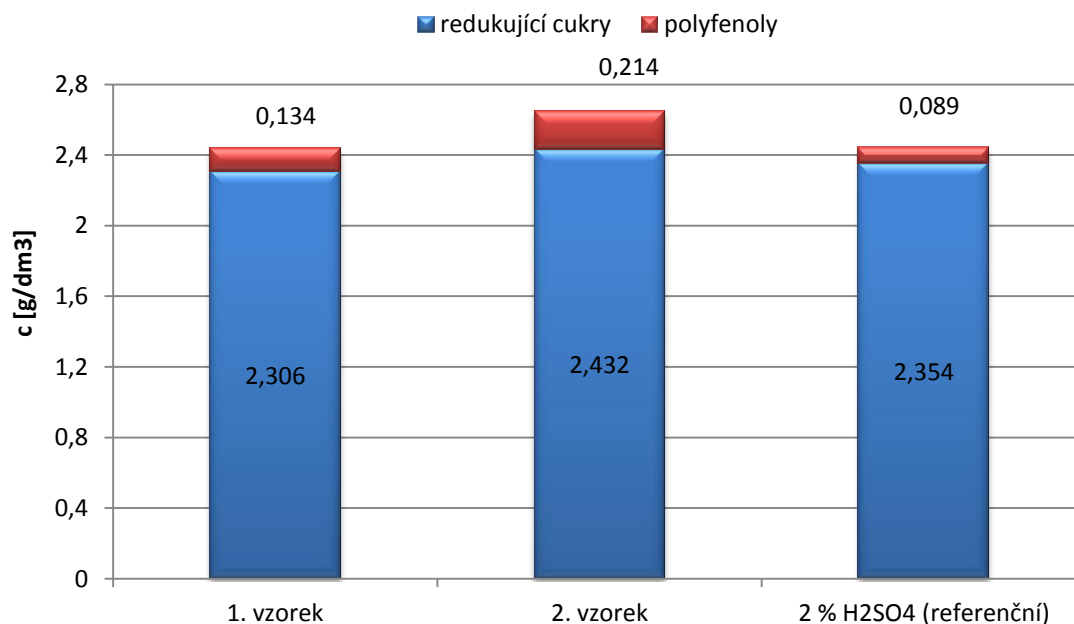
V tomto experimentu byl testován vliv minerální kyseliny (2 % kyselina sírová) a ultrazvuku na účinnost hydrolýzy pilin.

První vzorek:

- 1) Piliny v koncentraci 50 g/dm^3 + destilovaná voda.
- 2) Tento roztok byl sonifikován.
- 3) Následně do něj byla přidána kyselina sírová.

Druhý vzorek:

- 1) Piliny v koncentraci 50 g/dm^3 + destilovaná voda + H_2SO_4 (celková koncentrace kyseliny v roztoku = 2 %).
- 2) Tento roztok byl sonifikován.



Graf 5: Kombinace: předúprava kyselinou a sonifikace

V tomto experimentu byly zkoumány dva vzorky, které byly připraveny pomocí kombinace sonifikace a hydrolýzy v kyselině sírové.

Mírně vyšší koncentraci redukujících sacharidů měl vzorek č. 2. Ten byl připraven sonifikací roztoku s pilinami, jež obsahoval i 2 % H_2SO_4 . Koncentrace redukujících sacharidů v něm byla $2,43 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Bohužel měla sonifikace negativní vliv na koncentraci polyfenolů, která se oproti referenčnímu vzorku až trojnásobně zvýšila, nicméně tato skutečnost může indikovat i efektivní narušení struktury ligninu, které by se mohlo pozitivně projevit při enzymatické hydrolýze materiálu (viz Graf 5).

4.2.3. Alkalická předúprava (pomocí NaOH)

Chemická hydrolýza

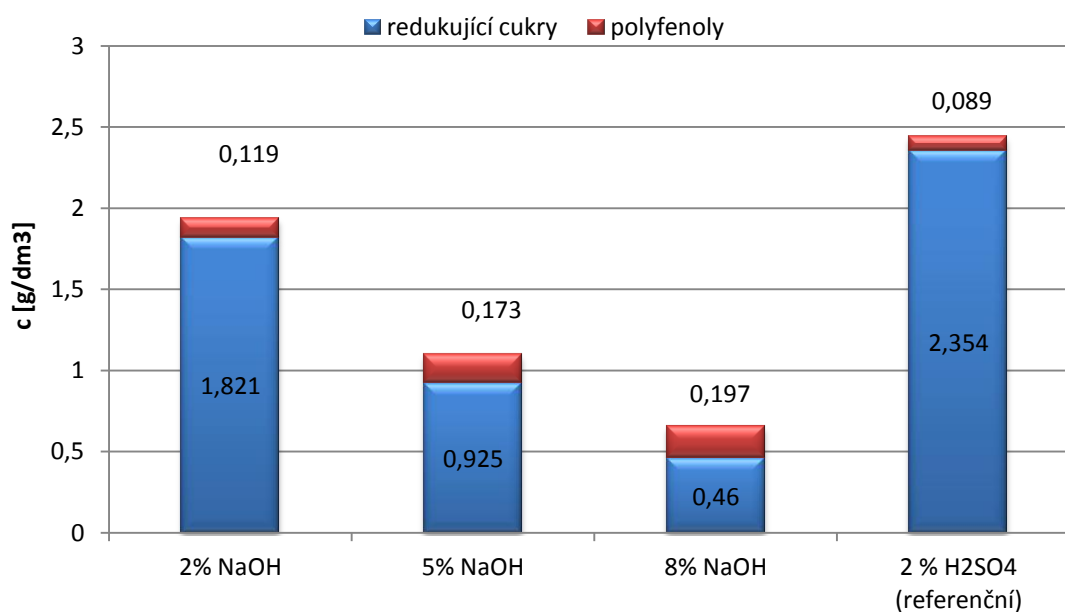
V tomto experimentu byl testován vliv luhování pilin v různě koncentrovaných roztocích NaOH před kyselou hydrolýzou.

Použité koncentrace hydroxidu sodného byly 2 %, 5 % a 8 %.

Hydrolyzáty, které byly takto připraveny, byly použity také pro enzymatickou hydrolýzu (viz kapitola 4.3.3).

Tabulka 7: Výsledky - alkalická předúprava (chemická hydrolýza)

NaOH	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
2 % NaOH	$1,822 \pm 0,183$	$119,1 \pm 14,4$
5 % NaOH	$0,925 \pm 0,059$	$173,1 \pm 14,1$
8 % NaOH	$0,460 \pm 0,030$	$197,8 \pm 2,8$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$



Graf 6: Alkalická předúprava (pomocí NaOH)

V tomto experimentu byl testován vliv koncentrace hydroxidu na účinnost hydrolýzy. Z předchozího grafu je zřejmé, že koncentrace redukujících cukrů je pro luhování v NaOH nižší než při hydrolýze v zředěné kyselině sírové. Naopak koncentrace polyfenolů byla u vzorků, jež byly luhovány v NaOH vyšší než u hydrolýzy v 2 % H₂SO₄ (viz Graf 6).

Z grafu lze také pozorovat, že při zvyšující se koncentraci NaOH, se snižoval výtěžek redukujících cukrů. Je pravděpodobné, že během alkalické předúpravy došlo k parciální extrakci hemicelulóz, což následně vedlo k nižším výtěžkům redukujících sacharidů po jejich kyselé hydrolýze. S rostoucí koncentrací NaOH je tento efekt patrnější. Stejně tak je možné interpretovat nárůst koncentrace polyfenolů, který může být považován za doklad parciálního

narušení struktury ligninu během alkalické předúpravy materiálu. Nicméně vysoké koncentrace polyfenolů jsou z pohledu fermentace hydrolyzátu problematické a proto jsme v dalších experimentech pracovali s 2 % NaOH.

Hydrolyzáty, které byly takto připraveny, byly použity také pro enzymatickou hydrolýzu.

4.2.4. Předúprava pomocí organických rozpouštědel – kyselina octová, 96 % ethanol

Chemická hydrolýza

V tomto experimentu byl testován vliv organických rozpouštědel na účinnost kyselé hydrolýzy odpadní dřevní biomasy.

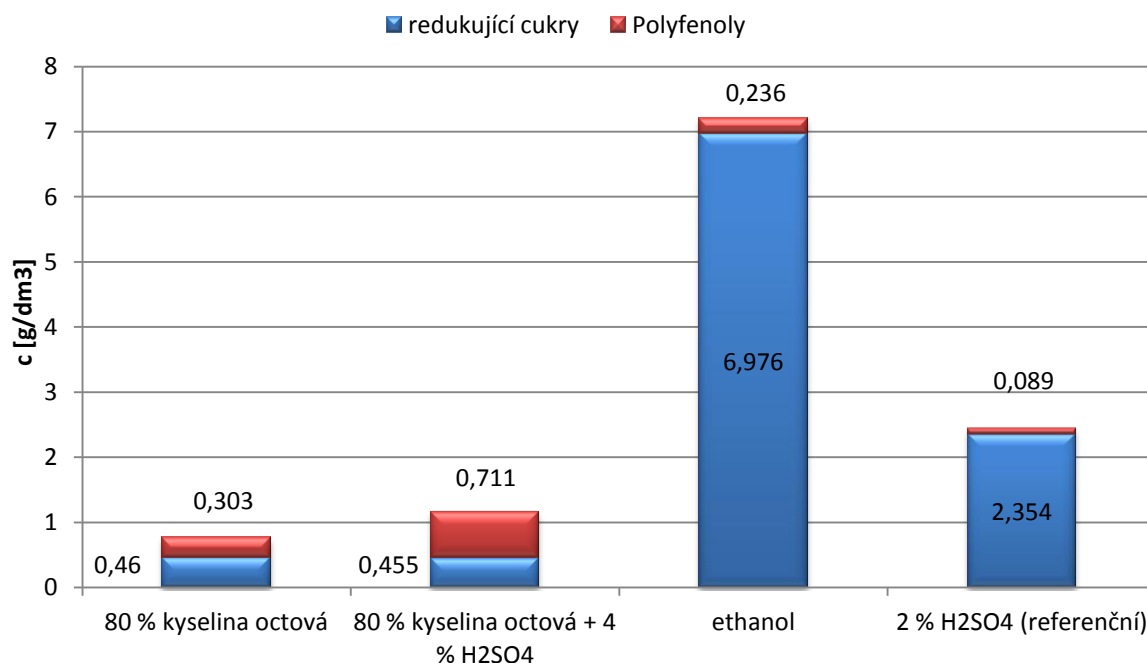
Testovanými rozpouštědly byly 96 % ethanol a kyselina octová.

V ethanolu byly piliny inkubovány před samotnou kyselou hydrolýzou po dobu 1 hodiny. Kyselina octová byla použita až pro hydrolýzu při vysoké teplotě.

Hydrolyzáty, které byly připraveny pomocí luhování pilin v 96 % ethanolu byly následně použity také pro enzymatickou hydrolýzu (viz 4.3.5).

Tabulka 8: Výsledky - organická rozpouštědla (po kyselé hydrolýze)

organická rozpouštědla	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
kyselina octová	$0,460 \pm 0,008$	$303,8 \pm 0,427$
kyselina octová + 4 % H_2SO_4	$0,455 \pm 0,036$	$711,2 \pm 32,2$
96 % ethanol	$6,976 \pm 0,558$	$235,9 \pm 14,1$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$



Graf 7: Předúprava pomocí organických rozpouštědel – kyselina octová, ethanol.

Při sledování vlivu organických rozpouštědel na účinnost hydrolýzy pilin (viz Graf 7) lze pozorovat, že 80 % kyselina octová není vhodnou látkou k jejich hydrolýze (ani pokud

je kombinována s kyselinou sírovou). Při jejím použití totiž oproti referenčnímu vzorku klesla koncentrace redukujících sacharidů (viz Tabulka 8).

Naopak jako velice pozitivní se ukázala předúprava pomocí ethanolu, která významně navýšila výtěžky redukujících cukrů po kyselé hydrolýze – výtěžek je téměř 3x vyšší oproti referenčnímu vzorku. I přesto, že podobný trend vykazovala také koncentrace polyfenolů, je možné konstatovat, že předúprava materiálu pomocí ethanolu je velice slibnou metodou.

4.2.5. Amoniakální exploze

Chemická hydrolýza

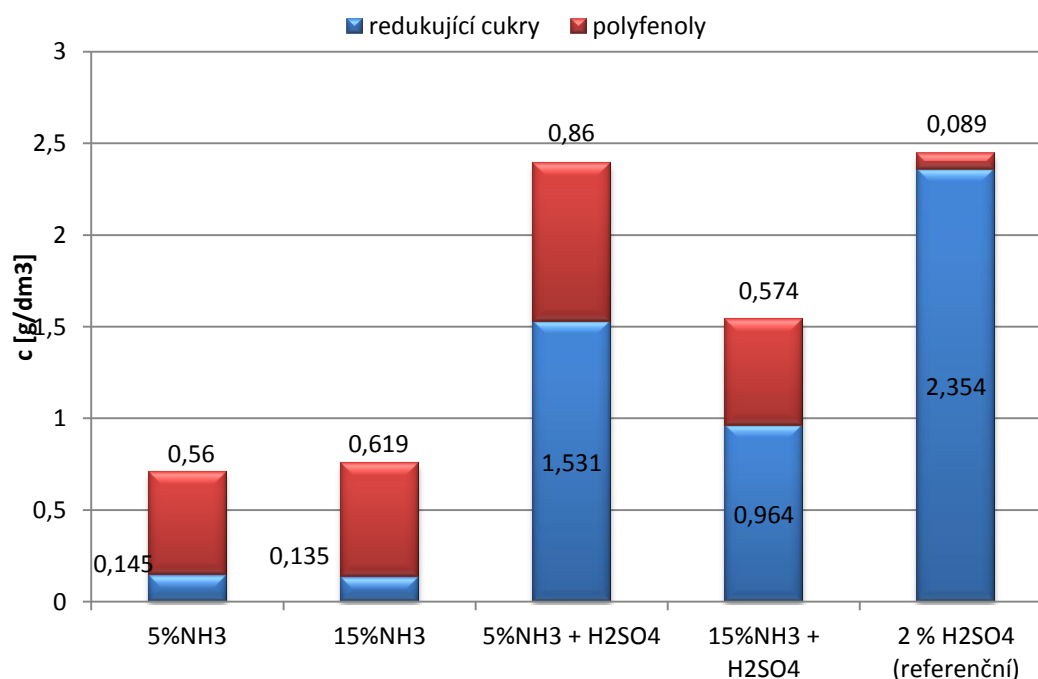
Při tomto měření byl zkoumán vliv amoniaku na následnou kyselou hydrolýzu pilin.

Byly použity dvě různé koncentrace NH_4OH : 5 % roztok NH_4OH a 15 % roztok NH_4OH .

Také byla použita kombinace těchto roztoků s 2 % H_2SO_4 .

Tabulka 9: Výsledky - amoniakální exploze (chemická hydrolýza)

Amoniakální expanse	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
5 % NH_4OH	$0,145 \pm 0,029$	$560,3 \pm 22,6$
15 % NH_4OH	$0,135 \pm 0,036$	$619,5 \pm 10,6$
5 % $\text{NH}_4\text{OH} + 2$ % H_2SO_4	$1,531 \pm 0,080$	$860,9 \pm 5,5$
15 % $\text{NH}_4\text{OH} + 2$ % H_2SO_4	$0,964 \pm 0,030$	$574,8 \pm 0,7$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$



Graf 8: Amoniakální exploze

Z grafu lze pozorovat, že použití 5 % roztoku NH_4OH a 15 % roztoku NH_4OH mělo na výtěžky fermentovatelných sacharidů oproti referenčnímu vzorku negativní vliv. Je velice pravděpodobné, že zde pozorujeme podobný efekt jako při alkalické předúpravě – použití

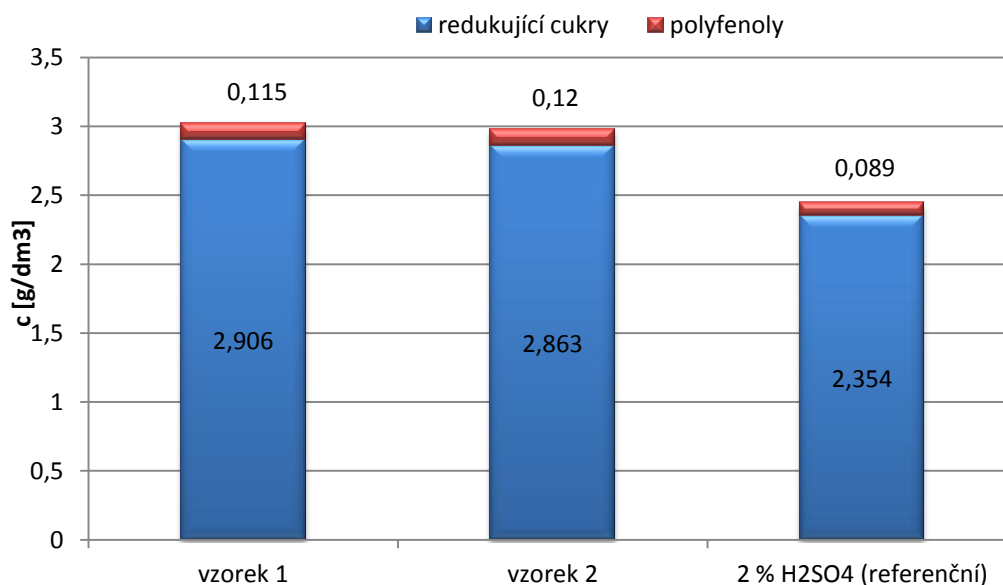
amoniakální exploze pravděpodobně vedlo k extrakci hemicelulóz, což následně snížilo výtěžek redukujících sacharidů po kyselé hydrolýze. Současné použití amoniaku a H_2SO_4 tento efekt parciálně eliminuje, protože výtěžky sacharidů jsou v těchto případech vyšší. Použití obou koncentrací amoniaku snížilo oproti kyselé hydrolýze kyselinou sírovou koncentraci redukujících cukrů přibližně 16krát (viz Tabulka 9).

Kombinace roztoků amoniaku a 2 % H_2SO_4 také není vhodnou metodou k hydrolýze pilin, a to z toho důvodu, že v porovnání s referenčním vzorkem snižuje koncentraci redukujících sacharidů a zvyšuje koncentraci polyfenolů (viz Graf 8).

4.2.6. Exploze vodní parou

4.2.6.1. 1. Měření – chemická hydrolýza

V tomto experimentu bylo zkoumáno jaký vliv má na hydrolýzu pilin jejich úprava ve vodní páře. Měření bylo provedeno na dvou vzorcích. Výsledky jsou zobrazeny v následujícím grafu (viz Graf 9).



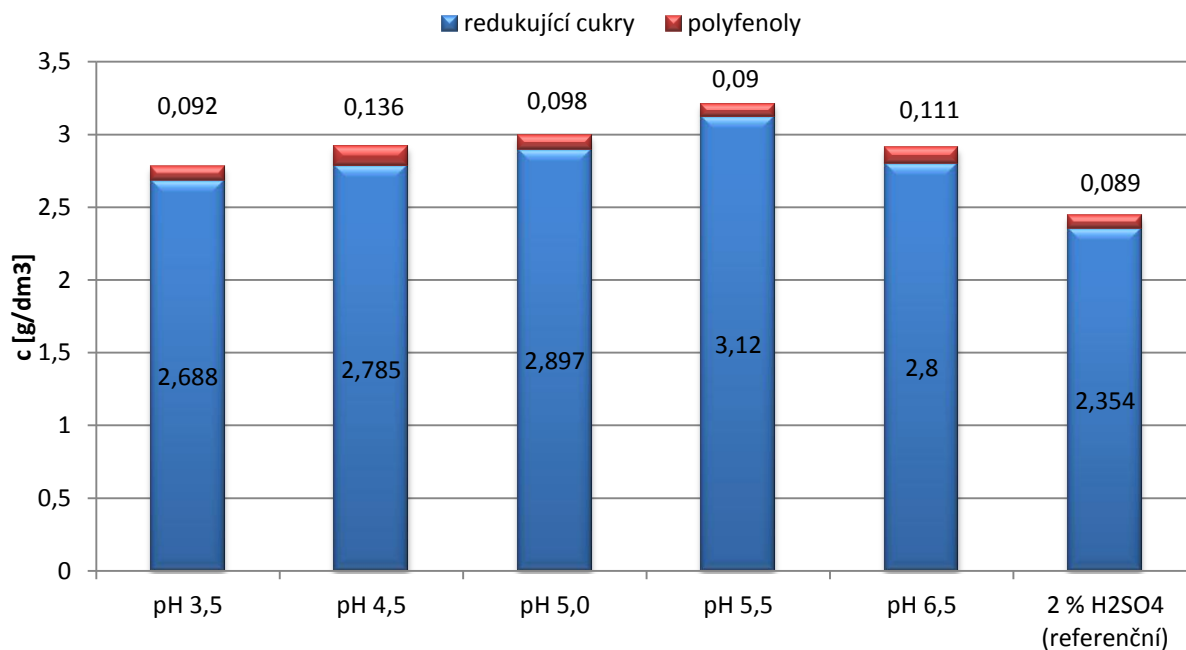
Graf 9: Exploze vodní parou (1. Měření)

Jak lze pozorovat z grafu v obou dvou vzorcích hydrolyzátů se oproti referenčnímu vzorku zvýšila koncentrace redukujících cukrů, ta byla v průměru $2,89 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Také bylo zjištěno, že koncentrace polyfenolů se zvýšila pouze nepatrně (viz Graf 9) na $118,1 \pm 3,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4.2.6.2. 2. Měření (úprava pH) – chemická hydrolýza

Při druhém měření bylo zkoumáno, jaké pH je pro úpravu pomocí vodní páry nejvhodnější. Protože tyto hydrolyzáty byly následně použity pro enzymatickou hydrolýzu, bylo zvoleno pH dle pH optima jednotlivých enzymů.

Úprava pH proběhla po expanzi vodní parou, tzn. po kyselé hydrolýze. Data, která jsou v následujícím grafu, byla získána po kyselé hydrolýze.



Graf 10: Exploze vodní parou (2. Měření) – chemická hydrolyza

Z dat, která byla naměřena, bylo zjištěno, že po úpravě pilin vodní parou, měl nejvyšší koncentraci redukujících sacharidů vzorek, jehož pH bylo po kyselé hydrolyze pomocí koncentrovaného roztoku NaOH upraveno na pH 5,5. Tato koncentrace byla $c = 3,1202 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento hydrolyzát měl také nejnížší koncentraci polyfenolů $c = 90,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jejich koncentrace byla srovnatelná s koncentrací polyfenolů v referenčním vzorku ($c = 89,52 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

4.2.7. Oxidační předúprava (pomocí H_2O_2)

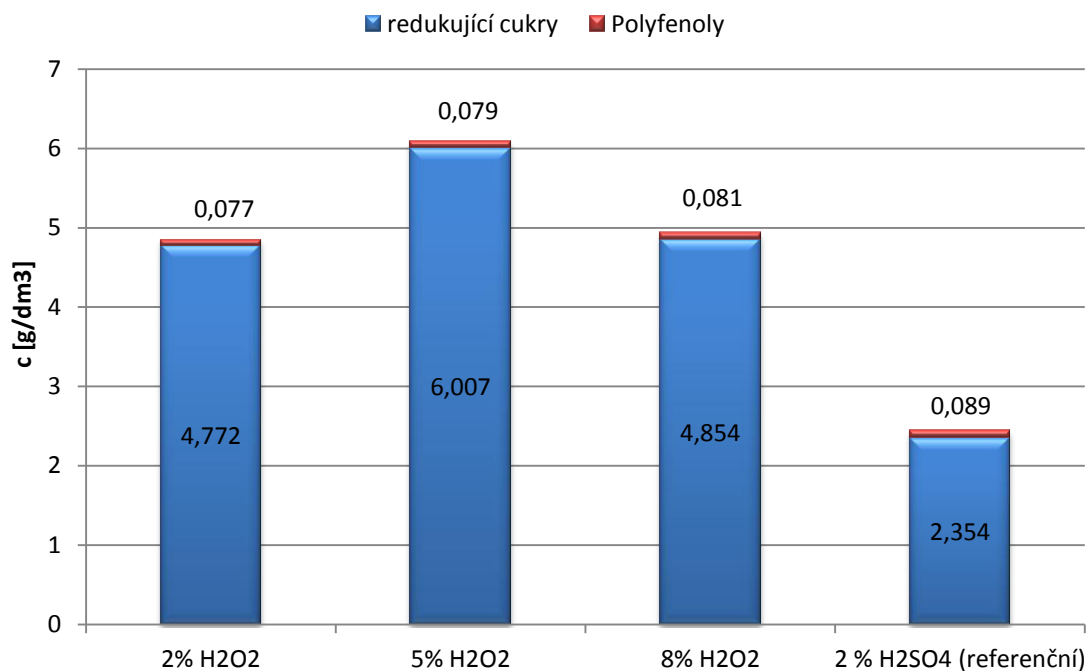
Chemická hydrolyza

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, která koncentrace peroxidu vodíku je nejvhodnější následnou kyselou hydrolyzu pilin. Doba luhovalání byla 120 minut.

Hydrolyzáty, které byly připraveny tímto způsobem byly použity také pro enzymatickou hydrolyzu (viz kapitola 4.3.4).

Tabulka 10: Výsledky - oxidační předúprava (po chemické hydrolyze)

H_2O_2	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
2 % H_2O_2	$4,772 \pm 0,017$	$77,9 \pm 1,8$
5 % H_2O_2	$6,007 \pm 0,657$	$79,2 \pm 1,5$
8 % H_2O_2	$4,854 \pm 0,294$	$81,4 \pm 1,3$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$



Graf 11: Oxidační předúprava (H_2O_2) – chemická hydrolýza

Dle získaných dat uvedených v předchozí tabulce (viz Tabulka 10) lze říct, že luhování pilin v peroxidu vodíku je metodou, která je vhodná pro zvýšení koncentrace redukujících cukrů. Z testovaných metod předúpravy je v rámci výtěžku redukujících sacharidů srovnatelná s předúpravou pomocí ethanolu.

Nejvyšší koncentraci redukujících sacharidů měl hydrolyzát, k jehož přípravě byly použity piliny, které se po dobu 2 hodin luhovaly v 5 % H_2O_2 . Koncentrace sacharidů narostla oproti referenčnímu vzorku z $c = 2,354 \pm 0,038 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ na $c = 6,007 \pm 0,657 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tato předúprava také nezvyšovala koncentraci polyfenolů (viz Graf 11) – u všech tří hydrolyzátů byla přibližně stejná jako v referenčním vzorku.

4.2.8. Optimalizace metod: luhování v NaOH, H_2O_2 a v ethanolu

Z předchozích měření bylo zjištěno, že luhování pilin v 2 % NaOH, 5 % H_2O_2 a v 96 % ethanolu má dobrý vliv na jejich následnou hydrolýzu (viz 4.2.3, 4.2.7, 4.2.8). Proto byly vybrány koncentrace, při kterých měly vzorky nejvyšší koncentraci redukujících sacharidů a nejnižší koncentraci polyfenolů. U těchto vzorků byla následně optimalizována doba luhování pilin. Zvolená doba byla: 30 minut, 60 minut a 120 minut.

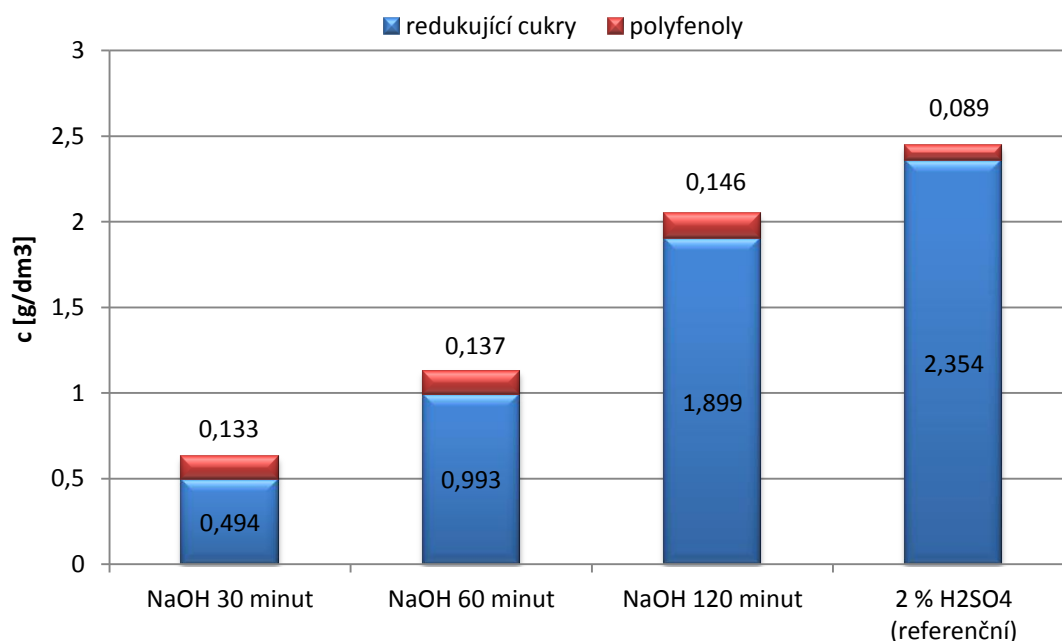
4.2.8.1. 5 % NaOH – chemická hydrolýza

Piliny byly v tomto experimentu nejdříve luhovány po danou dobu (30 minut, 60 minut a 120 minut) v roztoku 5 % NaOH. Po vysušení byly hydrolyzovány pomocí 2 % kyseliny sírové. V následující tabulce jsou uvedeny výsledné koncentrace redukujících sacharidů a polyfenolů po úpravě pilin touto metodou.

Tabulka 11: Výsledky - optimalizace doby luhování (chemická hydrolyza)

5 % NaOH	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
30 minut	$0,494 \pm 0,124$	$133,9 \pm 5,9$
60 minut	$0,993 \pm 0,075$	$137,4 \pm 6,5$
120 minut	$1,899 \pm 0,051$	$146,5 \pm 3,9$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$

V následujícím grafu je znázorněno, jaký vliv to měl tento způsob předúpravy na hydrolyzu pilin.



Graf 12: Optimalizace metod: luhování v NaOH (chemická hydrolyza)

Při optimalizaci doby luhování v 5 % NaOH bylo zjištěno, že čím delší je doba luhování pilin v něm, tím vyšší je koncentrace redukujících cukrů. To znamená, že nejvyšší koncentraci redukujících sacharidů měl vzorek, u kterého se piliny luhovaly po dobu 120 minut. Tato koncentrace byla $c = 1,899 \pm 0,051 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Ten samý vliv ale měla doba luhování pilin v 2 % NaOH také na polyfenoly, tzn., že jejich koncentrace se zvyšující se dobou luhování rosla.

Z grafu (viz Graf 12) lze pozorovat, že všechny 3 vzorky pro luhování v NaOH obsahovaly nižší množství redukujících sacharidů a vyšší množství polyfenolů než referenční vzorek, který byl připraven kyselou hydrolyzou pilin. Tato skutečnost bude pravděpodobně způsobena alkalickou extrakcí části hemicelulóz během předúpravy.

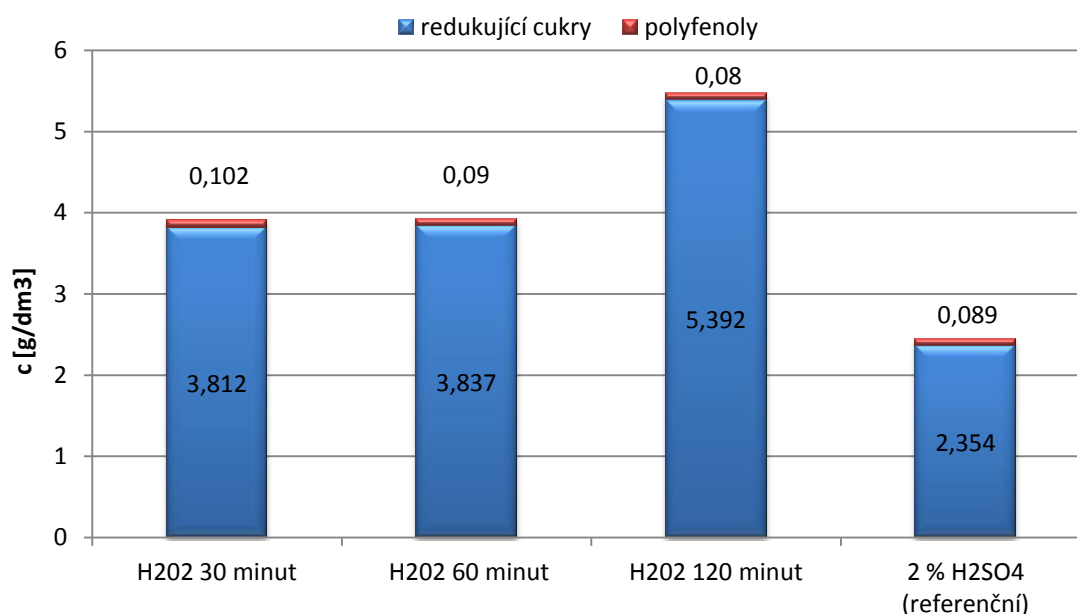
4.2.8.2. 5 % H_2O_2 – chemická hydrolyza

V tomto experimentu byl sledován vliv 5 % peroxidu vodíku na hydrolyzu pilin. Ty v něm byly nejprve luhovány 30 minut, 60 minut nebo 120 minut. Po vysušení byly hydrolyzovány pomocí 2 % kyseliny sírové. Výsledné koncentrace redukujících sacharidů a polyfenolů po této předúpravě jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 12: Výsledky – optimalizace doby luhování (po chemické hydrolyze)

5 % H_2O_2	redukující cukry [$g \cdot dm^{-3}$]	polyfenoly [$mg \cdot dm^{-3}$]
30 minut	$3,812 \pm 0,135$	$102,6 \pm 4,3$
60 minut	$3,837 \pm 0,315$	$90,5 \pm 4,1$
120 minut	$5,392 \pm 0,105$	$80,1 \pm 6,8$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$

Vliv této předúpravy na hydrolyzu je graficky znázorněn v následujícím grafu.



Graf 13: Optimalizace metod: luhování v peroxidu vodíku

Při optimalizaci doby luhování pilin v roztoku peroxidu vodíku bylo zjištěno, že je nejlepší piliny luhovat v 5 % H_2O_2 po dobu 120 minut. Koncentrace redukujících sacharidů byla v tomto vzorku $c = 5,392 \pm 0,105 g \cdot dm^{-3}$, což byla nejvyšší hodnota ze všech tří vzorků. Ve srovnání s referenčním vzorkem byla tato koncentrace téměř 2,5krát vyšší. V tom samém vzorku byla zároveň nejnižší koncentrace polyfenolů $c = 80,1 \pm 6,8 mg \cdot dm^{-3}$, což je koncentrace srovnatelná s koncentrací v referenčním vzorku (viz Tabulka 12).

Celkově lze zhodnotit, že čím delší je doba luhování, tím vyšší je koncentrace redukujících cukrů a nižší koncentrace polyfenolů v hydrolyzátu, což je žádaný trend. Je evidentní, že peroxid vodíku je schopen narušit komplexní strukturu lignocelulózy a tím zvýšit její hydrolyzovatelnost a zároveň pravděpodobně oxidačně degraduje fenolické látky lignocelulóz.

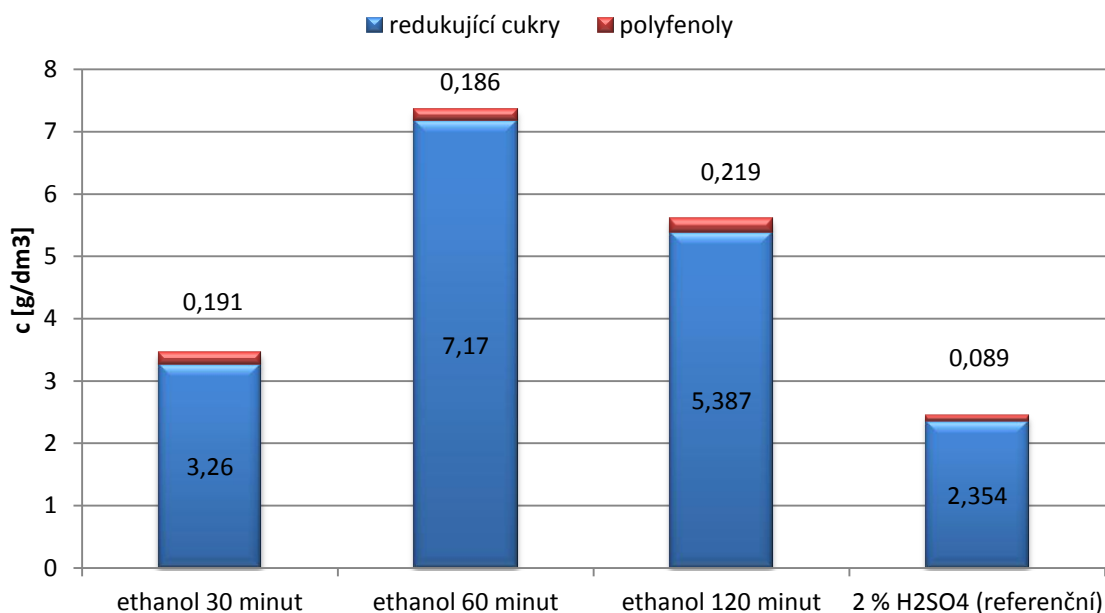
4.2.8.3. Ethanol – chemická hydrolýza

V tomto experimentu bylo pozorováno jaký vliv má luhování pilin v 96 % ethanolu na chemickou hydrolýzu pilin. Doba luhování byla 30 minut, 60 minut nebo 120 minut. Po vysušení byly piliny hydrolyzovány pomocí 2 % kyseliny sírové.

Tabulka 13: Výsledky – optimalizace doby luhování (po chemické hydrolýze)

96 % ethanol	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
30 minut	$3,261 \pm 0,208$	$191,1 \pm 11,8$
60 minut	$7,171 \pm 0,489$	$186,4 \pm 2,6$
120 minut	$5,387 \pm 0,069$	$219,7 \pm 7,5$
referenční vzorek	$2,354 \pm 0,038$	$89,0 \pm 1,9$

V následujícím grafu je znázorněn vliv této předúpravy na hydrolýzu pilin.



Graf 14: Optimalizace metod: luhování v ethanolu

Při zjišťování optimální doby luhování pilin v 96 % ethanolu bylo zjištěno, že nejvyšší koncentraci redukujících cukrů měl hydrolyzát, pro jehož přípravu se piliny luhovaly v ethanolu po dobu 60 minut. Koncentrace redukujících cukrů v tomto hydrolyzátu byla $c = 7,171 \pm 0,489 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, což je přibližně 3krát více než v referenčním vzorku.

Ten samý vzorek měl také nejnižší koncentraci polyfenolů, tj. $c = 186,4 \pm 2,6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ve srovnání s referenčním vzorkem se ale koncentrace polyfenolů zdvojnásobila.

4.3. Enzymatická hydrolýza

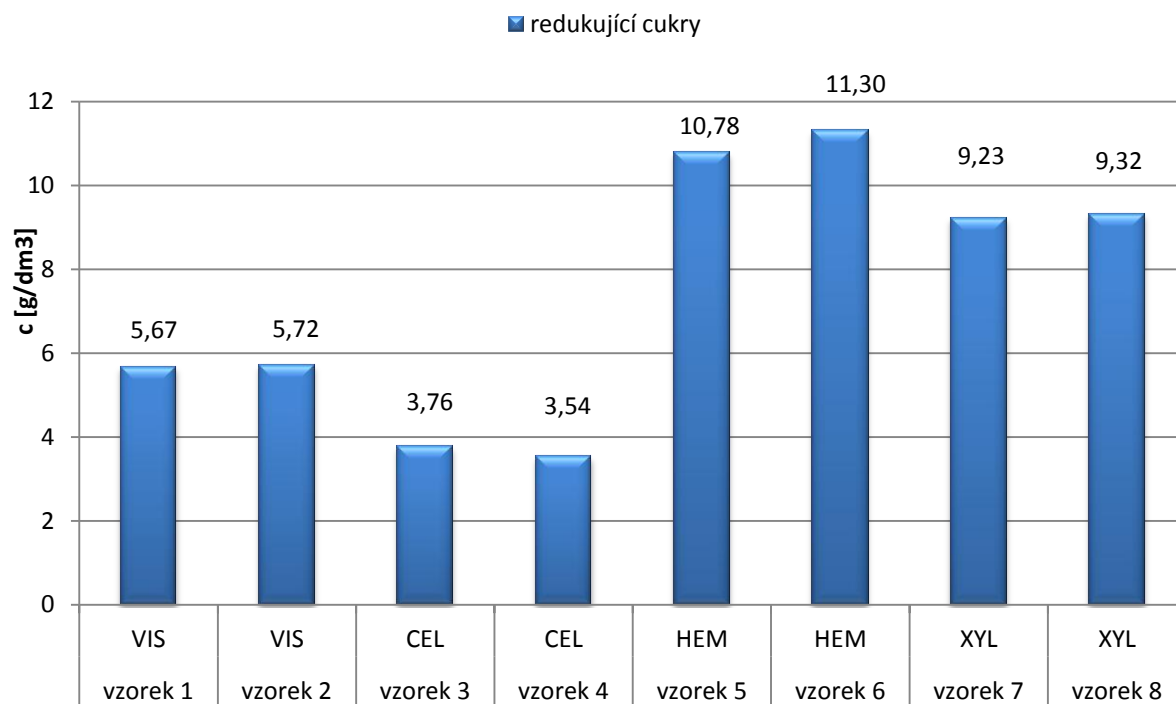
4.3.1. Exploze vodní parou

4.3.1.1. 1. Měření – enzymatická hydrolýza

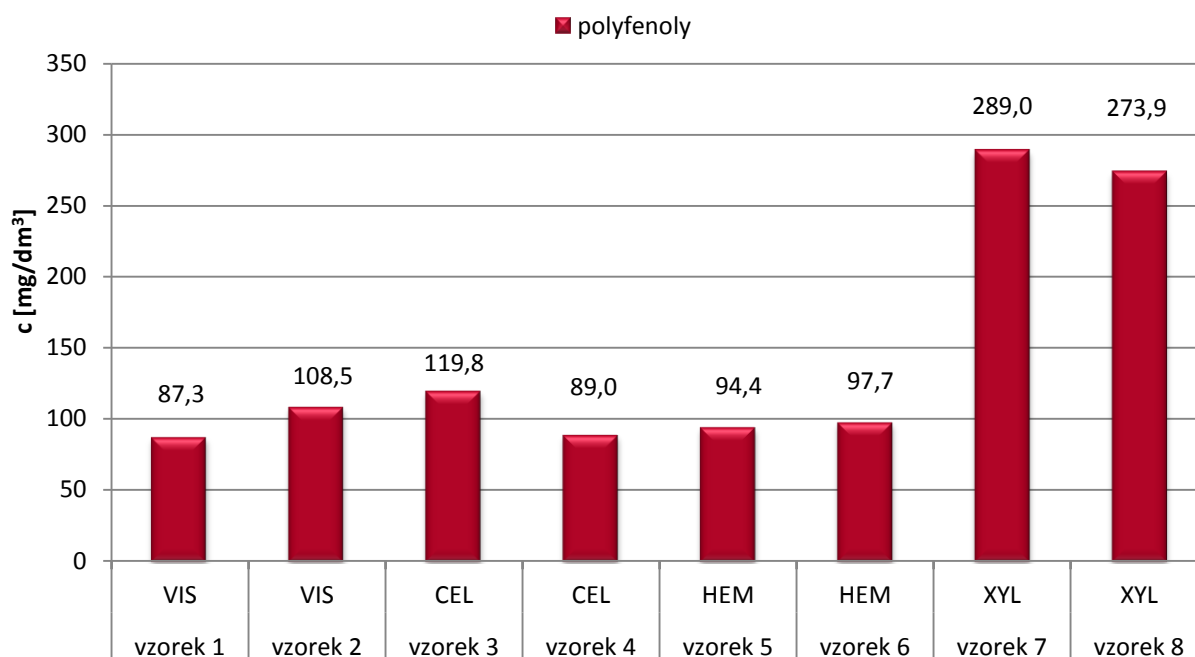
Pro toto měření byly použity vzorky z kapitoly 4.2.6. Tyto vzorky byly pro enzymatickou hydrolýzu kultivovány s vybranými enzymy. Příprava byla provedena dle následující tabulky (viz Tabulka 14).

Tabulka 14: Enzymatická hydrolýza – exploze vodní parou

vzorek	enzym	pH	T [°C]
1	viscozyme (0,5 obj%)	3,5	55
2			37
3	celuláza (0,5 obj%)	5,0	37
4			55
5	hemiceluláza (0,5 hm%)	5,5	37
6			55
7	xylanáza (0,5 hm%)	4,5	30
8			50



Graf 15: Exploze vodní parou – enzymatická hydrolýza (redukující cukry)



Graf 16: Exploze vodní parou – enzymatická hydrolýza (polyfenoly)

Získané hodnoty koncentrací jsou porovnávány s koncentracemi v původním hydrolyzátu získaném po chemické hydrolýze, které jsou uvedeny v předešlé kapitole.

Poté, co byla u hydrolyzátů připravených pomocí exploze vodní parou provedena enzymatická hydrolýza, došlo ke značnému navýšení koncentrace redukujících cukrů ve vzorcích. Každý vzorek po enzymatické hydrolýze měl oproti původnímu hydrolyzátu koncentraci cukrů výrazně vyšší (viz Graf 15).

Tabulka 15: Exploze vodní parou – enzymatická hydrolýza

vodní pára	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
<i>viscozyme</i>	$5,69 \pm 0,04$	$97,5 \pm 14,8$
<i>celuláza</i>	$3,64 \pm 0,16$	$104,0 \pm 21,2$
<i>hemiceluláza</i>	$11,04 \pm 0,37$	$95,50 \pm 2,12$
<i>xylanáza</i>	$9,28 \pm 0,07$	$281,0 \pm 11,2$
původní hydrolyzát (viz 4.2.6.1) (po chemické hydrolýze)	$2,89 \pm 0,03$	$118,1 \pm 3,5$

Pokud byla do hydrolyzátu přidána hemiceluláza, zvýšila se jejich koncentrace nejvíce. Hydrolyzáty, ve kterých byla hemiceluláza měly také nejmenší množství polyfenolů. Zdá se tedy, že i po kyselé hydrolýze obsahuje materiál stále vysoké množství hemicelulózy, která může být dále štěpena hemicelulázou a nebo xylanázou. Tato skutečnost je potvrzena relativně nízkou efektivitou aplikace celulázy, která se pravděpodobně nemohla efektivně

dostat ke svému substrátu. Komerční přípravek Viscozyme, který obsahuje kromě dominantní frakce celulózy také nízkou aktivitu hemicelulózy pak překonal co do výtěžku redukujících sacharidů vysoce purifikovanou celulózu. Při hydrolýze roztoků xylanázou byla zjištěna druhá největší koncentrace redukujících sacharidů, ale naopak koncentrace polyfenolů byla v těchto roztocích nejvyšší.

Koncentrace polyfenolů narostla pouze u vzorku, jehož teplota kultivace byla $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzhledem k nízké koncentraci redukujících cukrů po enzymatické hydrolýze s celulózou, nebyl tento enzym již pro další enzymatické hydrolýzy používán.

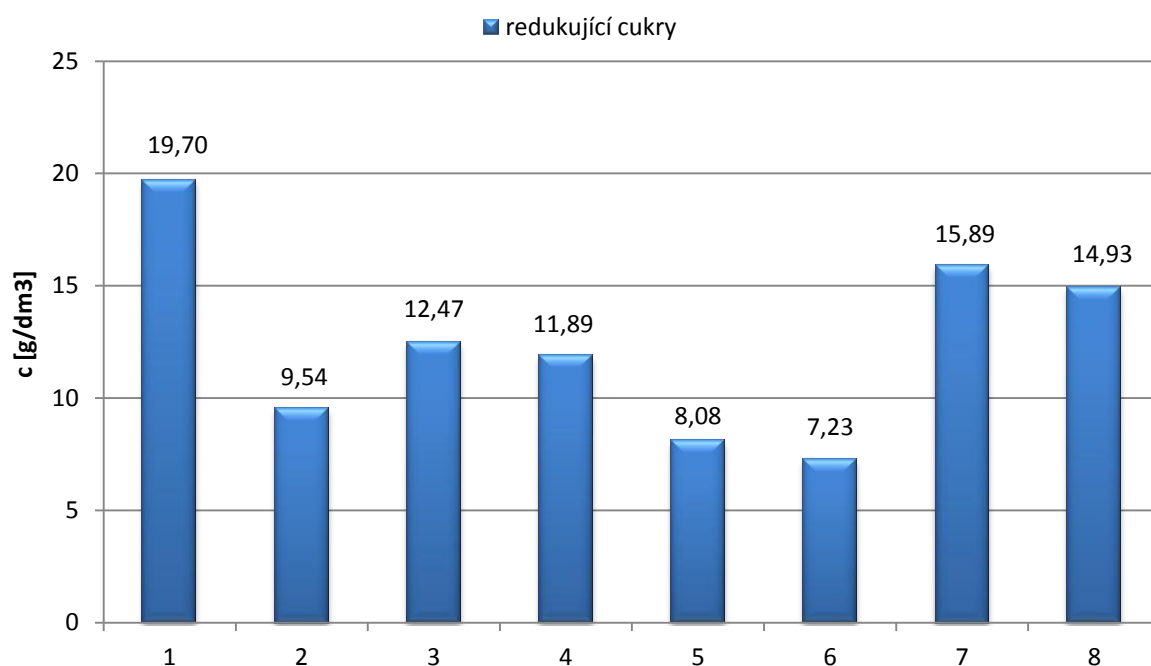
4.3.1.2. 2. Měření (úprava pH) – Enzymatická hydrolýza

Pro tuto enzymatickou hydrolýzu byly použity vzorky, které byly nejdříve použity v kapitole 4.2.6.2 pro chemickou hydrolýzu.

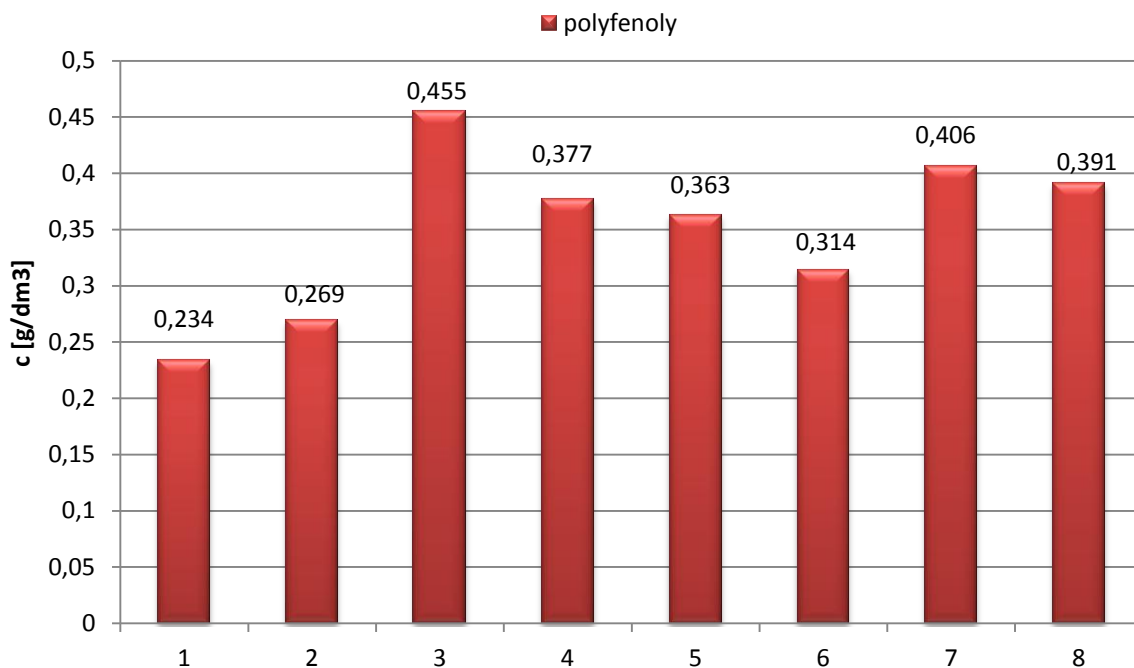
Vzorky byly připraveny podle následující tabulky (viz Tabulka 16).

Tabulka 16: Kombinace enzymů – enzymatická hydrolýza

vzorek	enzym 1	enzym 2	enzym 3	pH kultivace
1	viscozyme (2,5 obj%)	hemicelulóza (0,5 hm%)	-	pH 3,5
2	viscozyme (2,5 obj%)	hemicelulóza (0,5 hm%)	-	pH 5,5
3	viscozyme (2,5 obj%)	xylanáza (0,5 hm%)	-	pH 3,5
4	viscozyme (2,5 obj%)	xylanáza (0,5 hm%)	-	pH 4,5
5	hemicelulóza (0,5 hm%)	xylanáza (0,5 hm%)	-	pH 5,5
6	hemicelulóza (0,5 hm%)	xylanáza (0,5 hm%)	-	pH 4,5
7	hemicelulóza (0,5 hm%)	xylanáza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	pH 4,5
8	hemicelulóza (0,5 hm%)	xylanáza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	pH 3,5



Graf 17: Exploze vodní parou: kombinace enzymů – enzymatická hydrolýza (redukující cukry)



Graf 18: Exploze vodní parou: kombinace enzymů – enzymatická hydrolýza (polyfenoly)

Dle hodnot, které byly získány měřením množství redukujících cukrů v roztocích po enzymatické hydrolýze (viz Graf 17) bylo zjištěno, že jejich největší koncentraci obsahoval vzorek 1. Tento vzorek obsahoval kombinaci dvou enzymů: hemiceluláza, viscozyme. Kultivace roztoku byla při pH 3,5, což je pH optimum viscozymu. Teplota, při které byla provedena kultivace, byla 37 °C. Současná aplikace hemicelulázy a celulázy má tedy výrazný synergický efekt.

Koncentrace cukrů byla oproti původnímu hydrolyzátu, jež měl $c = 2,91 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ až sedmkrát vyšší, tj. $c = 19,70 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento vzorek také obsahoval nejmenší množství polyfenolů (viz Graf 18), a to $c = 234,02 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Protože při použití kombinace enzymů hemiceluláza a viscozyme, byla koncentrace polyfenolů nejmenší a koncentrace redukujících sacharidů nejvyšší, byla tato kombinace vybrána pro použití při následujícím měření.

4.3.2. Kyselá hydrolýza (pomocí 2 % H_2SO_4)

Enzymatická hydrolýza

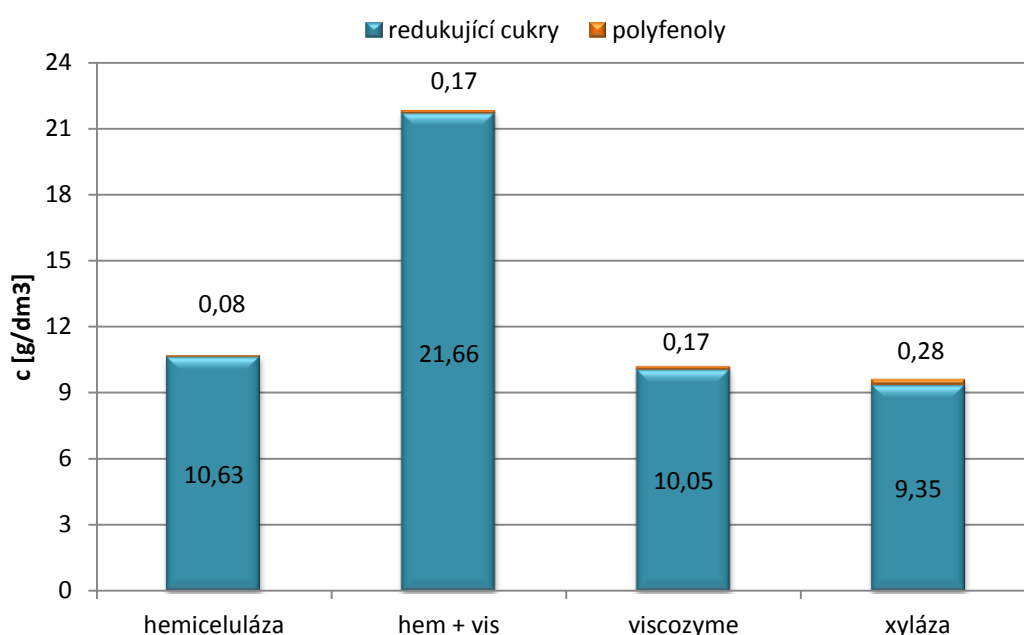
V tomto experimentu byla provedena enzymatická hydrolýza vzorku, které byly získány chemickou hydrolýzou pomocí zředěné kyseliny sírové.

Výsledné koncentrace jsou v následující tabulce.

Výsledky této enzymatické hydrolýzy byly použity jako referenční hodnoty v dalších kapitolách pro porovnání s ostatními enzymatickými hydrolýzami.

Tabulka 17: Kyselé předúprava – enzymatická hydrolýza

2 % H ₂ SO ₄	redukující cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
<i>hemiceluláza</i>	10,63 ± 0,33	88,51 ± 0,38
<i>hemiceluláza + viscozyme</i>	21,66 ± 0,68	179,3 ± 5,63
<i>viscozyme</i>	10,06 ± 0,87	179,8 ± 10,9
<i>xylanáza</i>	9,35 ± 0,38	280,6 ± 4,8
původní hydrolyzát (viz 4.2.1) (po chemické hydrolýze)	2,354 ± 0,038	89,0 ± 1,9



Graf 19: Kyselé předúprava – enzymatická hydrolýza

Dle získaných hodnot pro redukující sacharidy lze z tabulky vyhodnotit, že enzymatická hydrolýza výrazně zvyšuje koncentraci cukrů v hydrolyzátech pilin. Nejvíce koncentraci zvyšuje enzym hemiceluláza v kombinaci s viscozymem (viz Graf 19), stejně jako tomu bylo u materiálu připraveného pomocí expanze vodní parou.

Koncentrace polyfenolů se nesnížila pouze u vzorku, který byl získán při použití hemicelulázy. U všech ostatních došlo k nárůstu koncentrace polyfenolů.

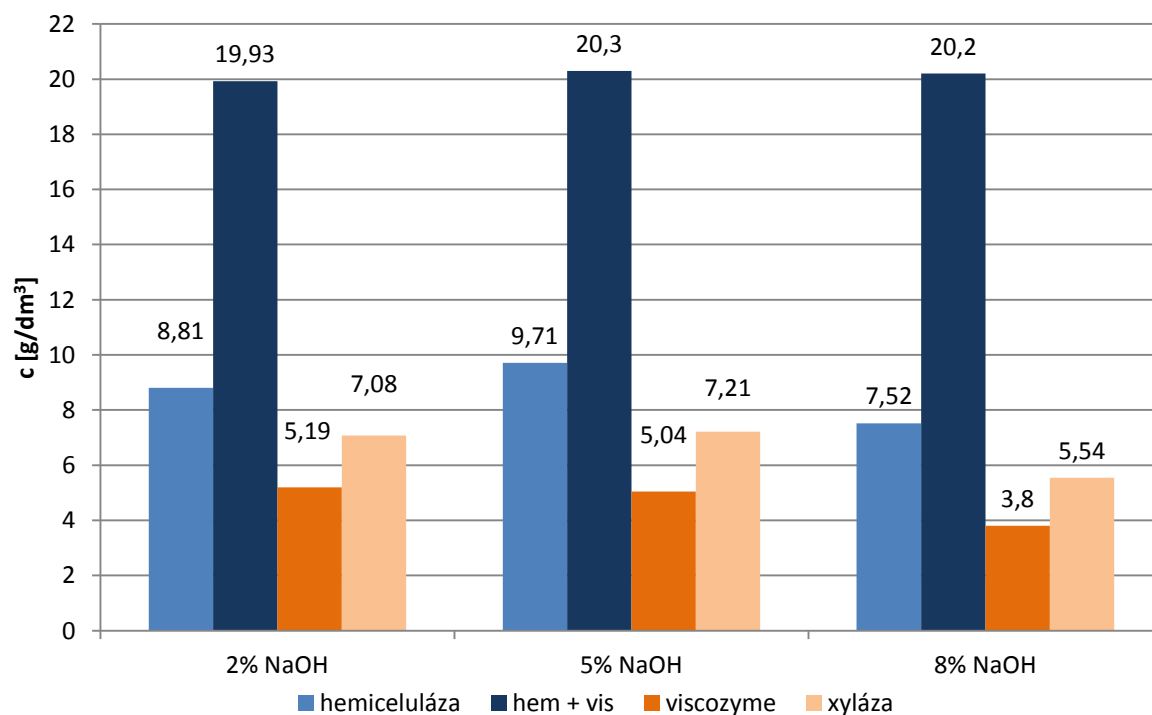
4.3.3. Alkalická předúprava (pomocí NaOH)

Enzymatická hydrolýza

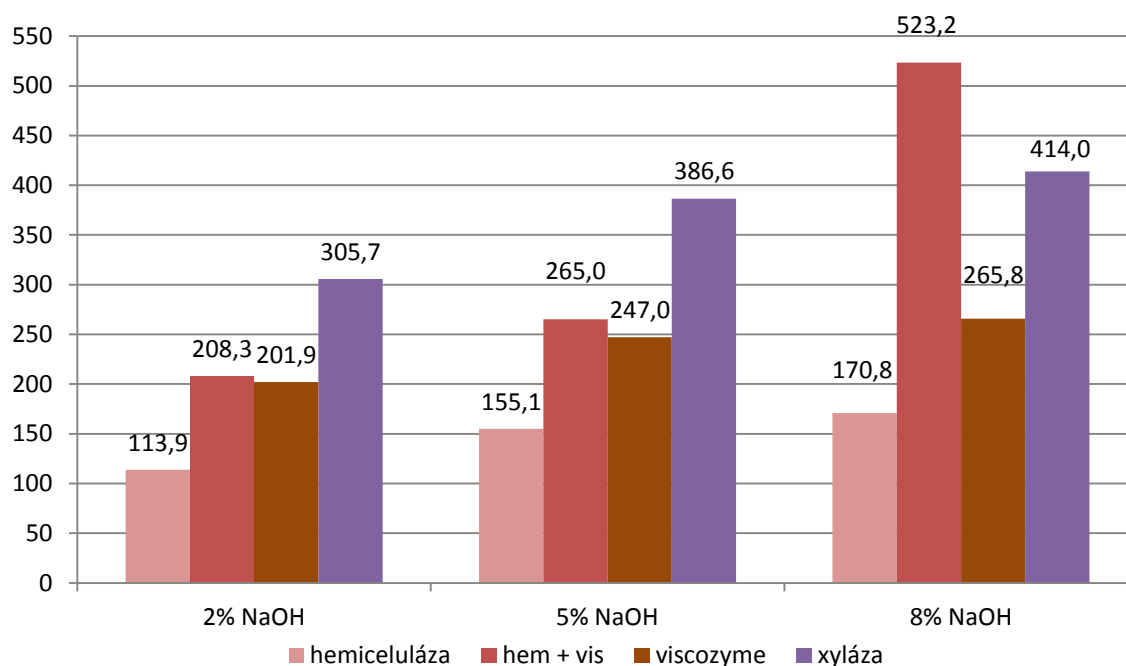
Pro toto měření byly použity vzorky získané chemickou hydrolýzou v kapitole 4.2.3. Byla u nich provedena enzymatická hydrolýza vybranými enzymy. Jejich příprava je zobrazena v následující tabulce (viz Tabulka 18).

Tabulka 18: Alkalická předúprava (enzymatická hydrolyza)

vzorek	NaOH (%)	enzym 1	enzym 2	red. cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
1	2	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	8,81 ± 0,56	113,9 ± 7,7
2		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	19,93 ± 0,30	208,3 ± 7,0
3		viscozyme (2,5 obj%)	-	5,19 ± 0,21	201,9 ± 12,4
4		xylanáza (0,5 hm%)	-	7,08 ± 0,12	305,7 ± 0,4
5	5	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	9,71 ± 0,26	155,1 ± 1,1
6		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	20,31 ± 0,04	265,0 ± 6,6
7		viscozyme (2,5 obj%)	-	5,04 ± 0,17	247,0 ± 9,3
8		xylanáza (0,5 hm%)	-	7,21 ± 0,28	386,6 ± 18,9
9	8	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	7,52 ± 0,20	170,8 ± 6,1
10		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	20,2 ± 0,34	523,2 ± 18,2
11		viscozyme (2,5 obj%)	-	3,80 ± 0,55	265,8 ± 9,9
12		xylanáza (0,5 hm%)	-	5,54 ± 0,21	414,0 ± 4,5



Graf 20: Enzymatická hydrolyza – redukující cukry



Graf 21: Enzymatická hydrolýza – polyfenoly

Při enzymatické hydrolýze roztoku, který byl připraven alkalickou hydrolýzou pilin, bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace redukujících cukrů mají vzorky, pro které byl při alkalické hydrolýze použit roztok 5 % NaOH (viz Graf 20). Což je rozdíl oproti množství redukujících cukrů bez enzymatické hydrolýzy – tam bylo nejvíce redukujících cukrů obsaženo v roztoku upraveném 2 % NaOH.

Naopak 8 % NaOH mělo po enzymatické hydrolýze nejvyšší množství polyfenolů (viz Tabulka 19) a nejnižší koncentraci redukujících sacharidů. 8 % NaOH je nejspíše příliš silná koncentrace hydroxidu, která narušuje strukturu ligninu a vede k uvolnění nežádoucích inhibičních produktů hydrolyzátu.

2 % NaOH měl po enzymatické hydrolýze sice nízkou koncentraci polyfenolů, která se nijak zvlášť nenavýšila oproti vzorkům bez enzymatické hydrolýzy, ale bohužel je tato koncentrace hydroxidu nízká na to, aby došlo k dostatečné hydrolýze sacharidů.

Tabulka 19: Výsledky – alkalická předúprava (enzymatická předúprava)

předúprava pomocí NaOH	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
<i>hemiceluláza</i>	$8,68 \pm 1,10$	$146,6 \pm 29,4$
<i>hemiceluláza + viscozyme</i>	$20,14 \pm 0,96$	$332,2 \pm 167,9$
<i>viscozyme</i>	$4,68 \pm 0,76$	$238,2 \pm 32,8$
<i>xylanáza</i>	$6,61 \pm 0,93$	$368,8 \pm 56,3$
<i>původní hydrolyzáť (viz 4.2.3) (po chemické hydrolýze)</i>	$1,822 \pm 0,183$	$119,1 \pm 14,4$

Protože měl hydrolyzát získaný luhováním pilin v 5 % roztoku NaOH a následné hydrolýze nejvyšší výtěžky redukujících sacharidů a střední hodnoty koncentrace polyfenolů byl použit v kapitole 4.3.6 pro optimalizaci doby luhování pilin v NaOH.

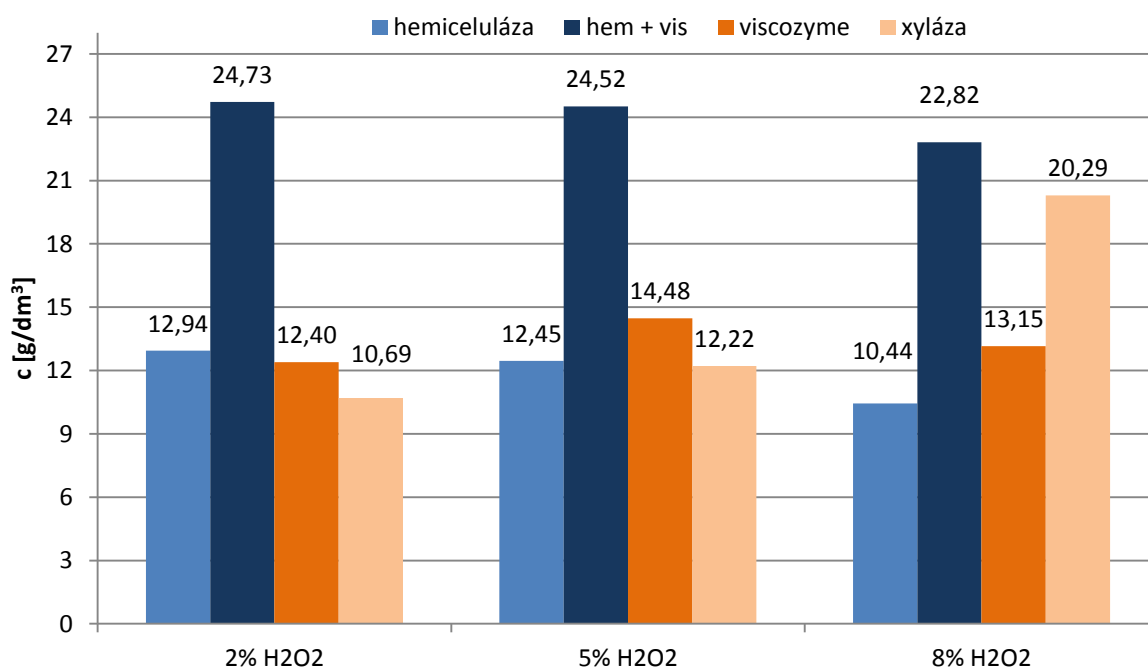
4.3.4. Oxidační předúprava – luhování v H_2O_2

Enzymatická hydrolýza

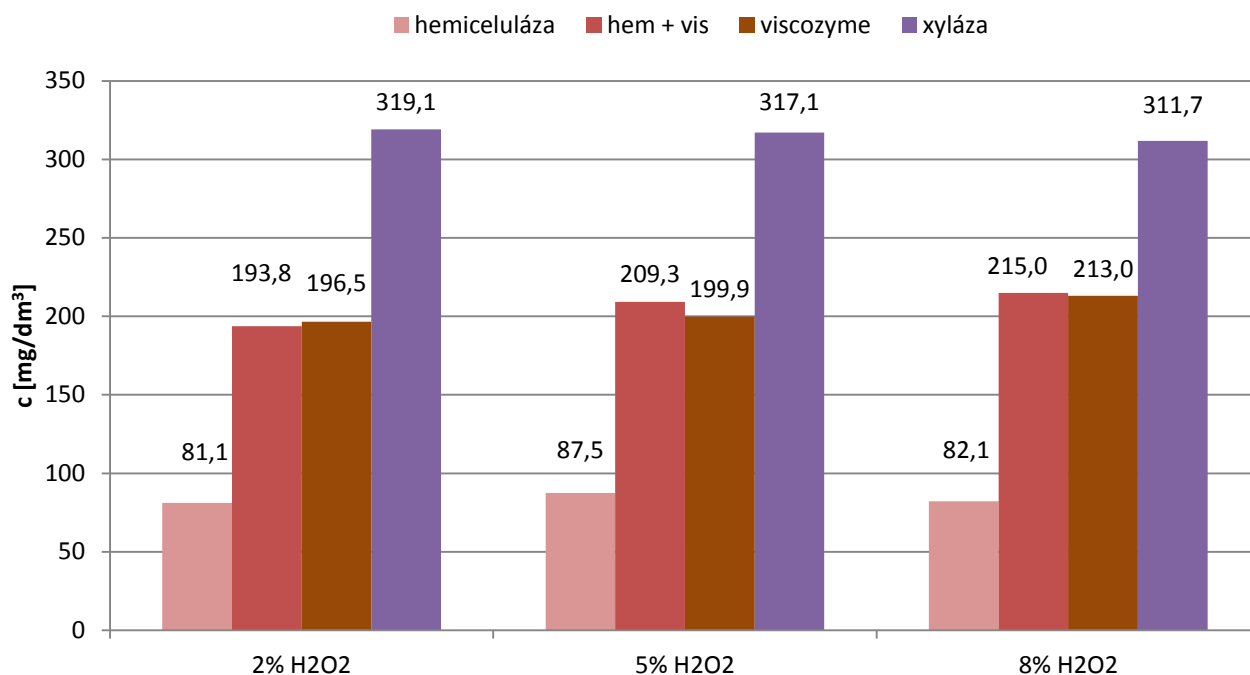
K této enzymatické hydrolýze byly použity vzorky připravené pro měření v kapitole 4.2.7 (chemická hydrolýza). Tyto materiály byly hydrolyzovány enzymy dle následující tabulky (viz Tabulka 20).

Tabulka 20: Oxidační předúprava – enzymatická hydrolýza

vzorek	H_2O_2 (%)	enzym 1	enzym 2	red. cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
1	2	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	12,94 ± 0,06	81,1 ± 0,4
2		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	24,73 ± 0,76	193,8 ± 1,5
3		viscozyme (2,5 obj%)	-	12,40 ± 0,34	196,5 ± 4,9
4		xylanáza (0,5 hm%)	-	10,69 ± 0,61	319,1 ± 5,4
5	5	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	12,45 ± 0,55	87,5 ± 2,8
6		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	24,52 ± 0,81	209,3 ± 7,7
7		viscozyme (2,5 obj%)	-	14,48 ± 1,36	199,9 ± 4,8
8		xylanáza (0,5 hm%)	-	12,22 ± 0,06	317,1 ± 3,0
9	8	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	10,44 ± 0,05	82,1 ± 1,5
10		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj%)	22,82 ± 0,35	215,0 ± 1,1
11		viscozyme (2,5 obj%)	-	13,15 ± 1,05	213,0 ± 8,5
12		xylanáza (0,5 hm%)	-	20,29 ± 0,18	311,7 ± 1,1



Graf 22: Enzymatická hydrolýza – redukující cukry



Graf 23: Enzymatická hydrolýza – polyfenoly

Pokud byla enzymatická hydrolýza provedena pro hydrolyzáty pilin, jež byly různou dobu luhovány v roztocích peroxidu vodíku o různých koncentracích, bylo zjištěno, že nejvíce působí enzymy na hydrolýzu cukrů, pokud byl k předúpravě použit roztok 5 % H₂O₂ (viz Graf 22). Stejně jako v předchozích případech došlo k nejučinnější hydrolýze dřevní biomasy při aplikování kombinace enzymů viscozyme a hemiceluláza. Výtěžek redukujících sacharidů dosáhl v tomto případě 25 g · dm⁻³, což už je z biotechnologického pohledu zajímavá hodnota. Co se týče polyfenolů, bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací peroxidu vodíku použitého pro předúpravu pilin, se v těchto hydrolyzátech po enzymatické hydrolýze zvyšuje i koncentrace polyfenolů (viz Graf 23).

Tabulka 21: Výsledky – oxidační předúprava (po enzymatické hydrolýze)

oxidační předúprava (H ₂ O ₂)	redukující cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
<i>hemiceluláza</i>	11,94 ± 11,94	83,6 ± 3,4
<i>hemiceluláza + viscozyme</i>	24,02 ± 1,04	206,0 ± 11,0
<i>viscozyme</i>	13,34 ± 1,05	203,1 ± 8,7
<i>xylanáza</i>	14,40 ± 5,16	316,0 ± 3,8
původní hydrolyzát (viz 4.2.7) (po chemické hydrolýze)	6,007 ± 0,657	79,2 ± 1,5

Celkově ale dle tabulky lze říci, že tato metoda byla účinná, protože vzhledem k původnímu hydrolyzátu získanému v kapitole 4.2.7 se koncentrace cukrů z maximální

získané hodnoty $6,007 \pm 0,657 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ zvýšila u všech vzorků. Koncentrace polyfenolů zůstala přibližně stejná pouze při použití hemicelulázy. Zároveň byly výtěžky redukujících sacharidů po enzymatické hydrolyze vyšší než u předchozích metod.

4.3.5. Organická rozpouštědla

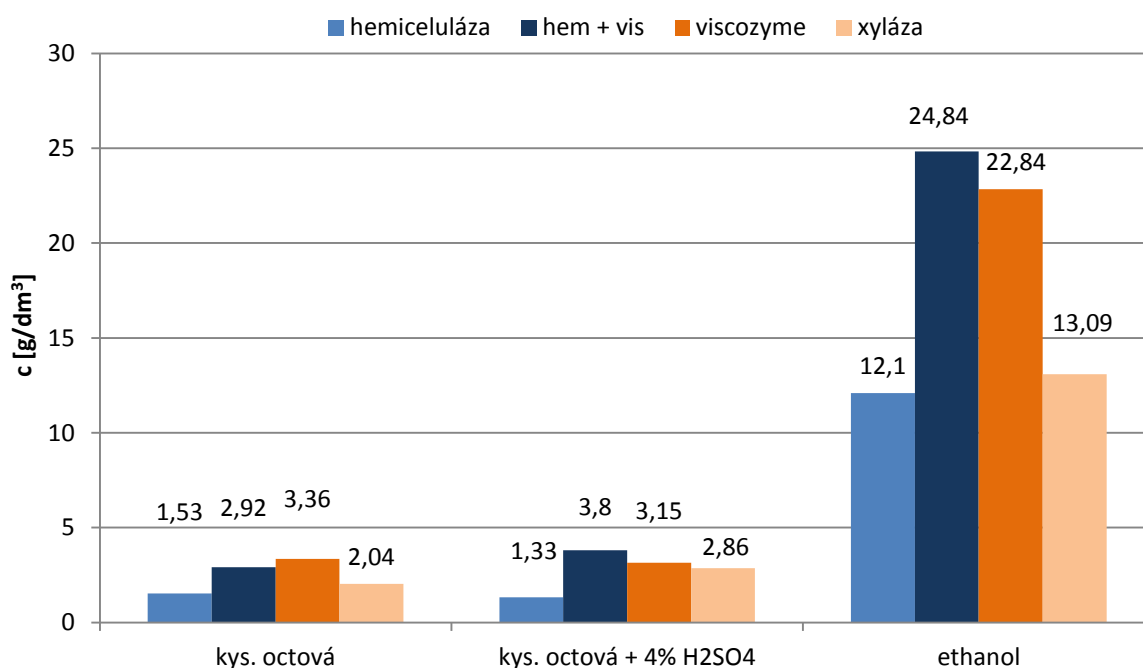
Enzymatická hydrolyza

Tato enzymatická hydrolyza byla provedena pro hydrolyzáty, jež byly připraveny v kapitole 4.2.4 – luhováním pilin ve vybraných organických rozpouštědlech. K jejich přípravě byla použita kyselina octová, její kombinace s 4 % kyselinou sírovou a 96 % ethanol.

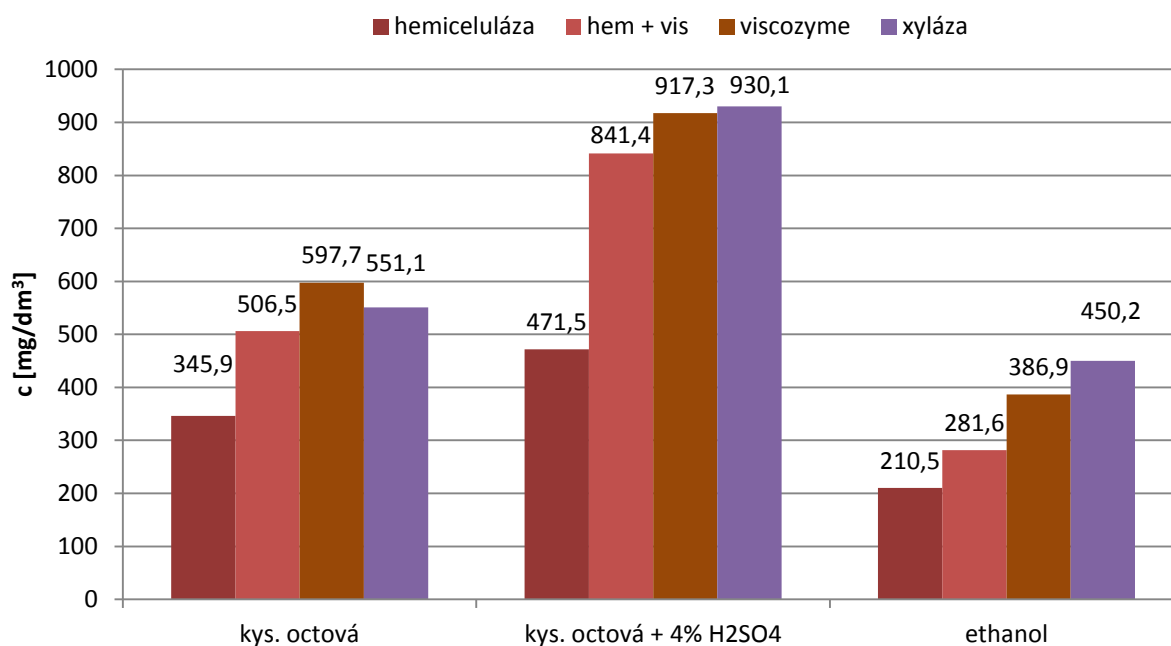
Vzorky pro enzymatickou hydrolyzu byly připraveny dle následující tabulky.

Tabulka 22: Výsledky - Organická rozpouštědla (enzymatická hydrolyza)

vzorek	složení	enzym 1	enzym 2	red. cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
1	kyselina octová	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	1,53 ± 0,27	345,9 ± 30,7
2		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj %)	2,92 ± 0,08	506,5 ± 42,0
3		viscozyme (2,5 obj%)	-	3,36 ± 0,27	597,7 ± 12,8
4		xylanáza (0,5 hm%)	-	2,04 ± 0,22	551,1 ± 11,5
5	kyselina octová + 4% H ₂ SO ₄	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	1,33 ± 0,04	471,5 ± 37,3
6		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj %)	3,80 ± 0,17	841,4 ± 41,6
7		viscozyme (2,5 obj%)	-	3,15 ± 0,37	917,3 ± 96,2
8		xylanáza (0,5 hm%)	-	2,86 ± 0,27	930,1 ± 57,6
9	ethanol	hemiceluláza (0,5 hm%)	-	12,1 ± 1,12	210,5 ± 11,4
10		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj %)	24,84 ± 2,14	281,6 ± 3,5
11		viscozyme (2,5 obj%)	-	22,84 ± 1,17	386,9 ± 38,5
12		xylanáza (0,5 hm%)	-	13,09 ± 0,33	450,2 ± 13,6



Graf 24: Enzymatická hydrolyza - redukující cukry



Graf 25: Enzymatická hydrolýza – polyfenoly

U vzorků upravených pomocí luhování v 96 % ethanolu došlo po enzymatické k výraznému nárůstu koncentrace redukujících cukrů, a to hlavně pokud byl použit enzym viscozyme.

Jak lze pozorovat, koncentrace redukujících sacharidů pro vzorky, které byly připraveny hydrolýzou pilin v kyselině octové, se nezvýšila ani po jejich následné enzymatické hydrolýze. Koncentrace polyfenolů, ale byla mnohem vyšší (viz Graf 25) než při přípravě pomocí ethanolu.

Při použití kombinace enzymů hemiceluláza a viscozyme byla získán nejvyšší výtěžek redukujících cukrů a koncentrace polyfenolů se oproti původnímu hydrolyzátu nezvýšila tak moc, jako u ostatních enzymů. Ve srovnání s předešlými metodami, pro které byla provedena enzymatická hydrolýza, byla dle výsledků po enzymatické hydrolýze předúprava pomocí 96 % ethanolu nejúčinnější.

Tabulka 23: Enzymatická hydrolýza - výsledky

ETHANOL	redukující cukry [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	polyfenoly [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
<i>hemiceluláza</i>	$12,10 \pm 1,12$	$210,5 \pm 11,4$
<i>hemiceluláza + viscozyme</i>	$24,84 \pm 2,14$	$281,6 \pm 3,5$
<i>viscozyme</i>	$22,84 \pm 1,17$	$386,9 \pm 38,5$
<i>xylanáza</i>	$13,09 \pm 0,33$	$450,2 \pm 13,6$
původní hydrolyzáat (viz 4.2.4) (po chemické hydrolýze)	$6,976 \pm 0,558$	$235,9 \pm 14,1$

4.3.6. Optimalizace metod – luhování v NaOH, H₂O₂ a ethanolu

Enzymatická hydrolyza

V tomto experimentu byl studován časový průběh předúpravy pomocí NaOH, H₂O₂ a 96 % ethanolu na výtěžky kompletního (chemická hydrolyza + enzymatická hydrolyza) hydrolytického postupu. Vzorky pro všechny tři látky byly připraveny dle následující tabulky.

Tabulka 24: Optimalizace metod: příprava vzorků pro enzymatickou hydrolyzu

vzorek	doba luhoání	enzym 1	enzym 2
1	30 minut	hemiceluláza (0,5 hm%)	-
2		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj %)
3		viscozyme (2,5 obj%)	-
4		xylanáza (0,5 hm%)	-
5	60 minut	hemiceluláza (0,5 hm%)	-
6		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj %)
7		viscozyme (2,5 obj%)	-
8		xylanáza (0,5 hm%)	-
9	120 minut	hemiceluláza (0,5 hm%)	-
10		hemiceluláza (0,5 hm%)	viscozyme (2,5 obj %)
11		viscozyme (2,5 obj%)	-
12		xylanáza (0,5 hm%)	-

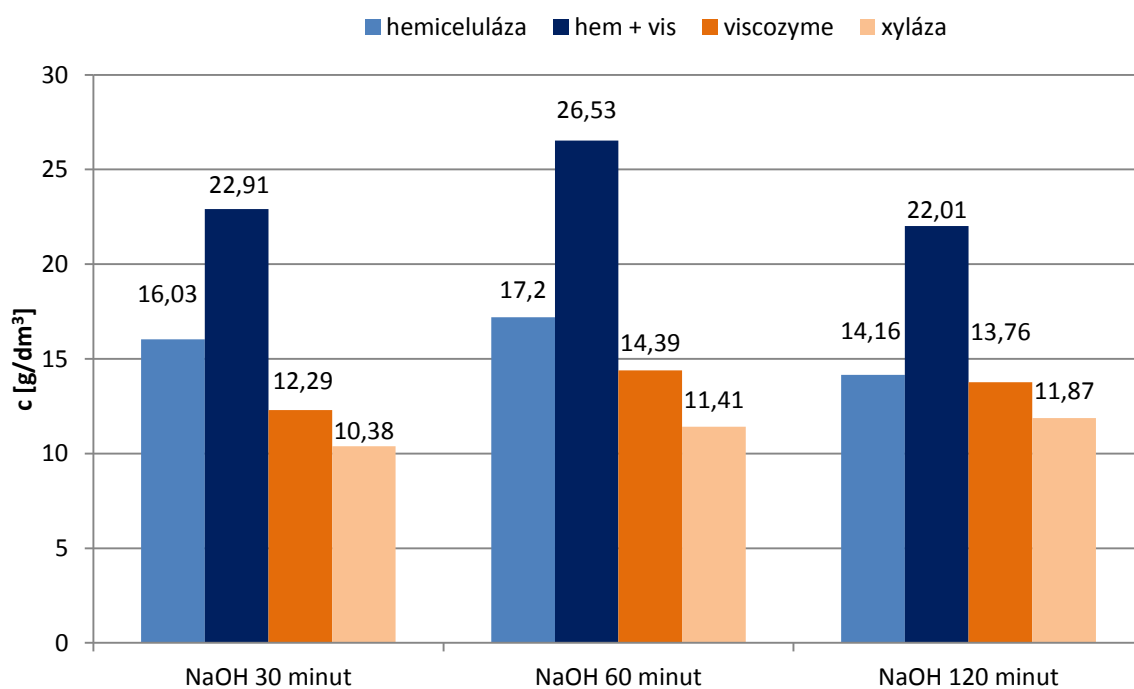
4.3.6.1. 5 % NaOH – enzymatická hydrolyza

V kapitole 4.3.3 bylo zjištěno, že pro předúpravu pilin pomocí NaOH a následnou enzymatickou hydrolyzou těchto vzorků, je nejlepší použít roztok, který obsahoval 5 % NaOH. Proto byla provedena optimalizace doby luhoání pilin v 5 % NaOH.

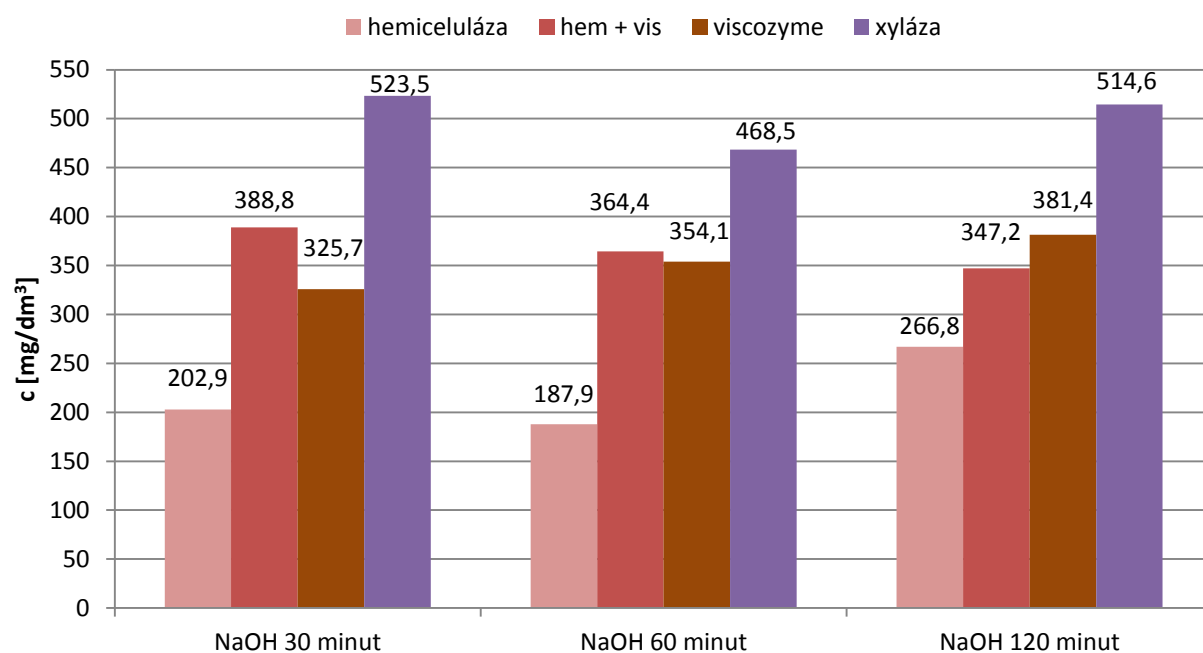
Tabulka 25: Výsledky - luhoání pilin v 5 % NaOH (enzymatická hydrolyza)

5 % NaOH		redukující cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
30 minut	hemiceluláza	16,03 ± 2,36	202,9 ± 2,9
	hem + vis	22,92 ± 0,71	388,9 ± 33,6
	viscozyme	12,30 ± 0,36	325,8 ± 1,5
	xylanáza	10,38 ± 0,31	523,5 ± 36,2
60 minut	hemiceluláza	17,20 ± 1,11	187,9 ± 3,4
	hem + vis	26,53 ± 0,20	364,5 ± 11,1
	viscozyme	14,40 ± 0,13	354,1 ± 14,3
	xylanáza	11,41 ± 0,42	468,5 ± 5,7
120 minut	hemiceluláza	14,16 ± 0,11	266,8 ± 0,4
	hem + vis	22,02 ± 0,73	347,2 ± 3,5
	viscozyme	13,77 ± 0,50	381,5 ± 3,7
	xylanáza	11,88 ± 0,68	514,7 ± 10,2

Jednotlivé koncentrace jsou graficky znázorněny v následujících grafech.



Graf 26: Enzymatická hydrolyza (NaOH) - redukující cukry



Graf 27: Enzymatická hydrolyza (NaOH) – polyfenoly

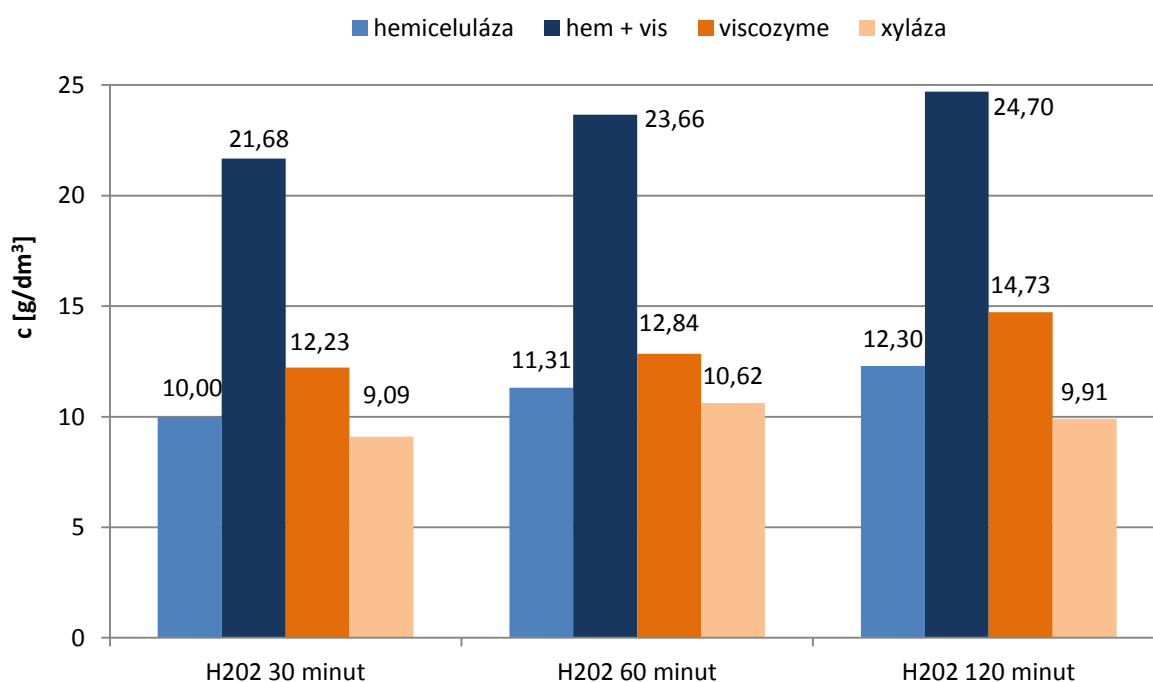
Pro luhování pilin v 5 % NaOH bylo po enzymatické hydrolyze vzorků zjištěno, že optimální doba luhování na to, aby došlo k maximálnímu zvýšení koncentrace redukujících cukrů, je 60 minut (viz Graf 26). Ta samá doba je optimální i pro koncentraci celkových polyfenolů. Pokud jsou piliny luhovány v 5 % NaOH delší dobu, dochází k většímu uvolňování polyfenolů a snížení koncentrace redukujících cukrů.

4.3.6.2. 5 % H₂O₂ – enzymatická hydrolyza

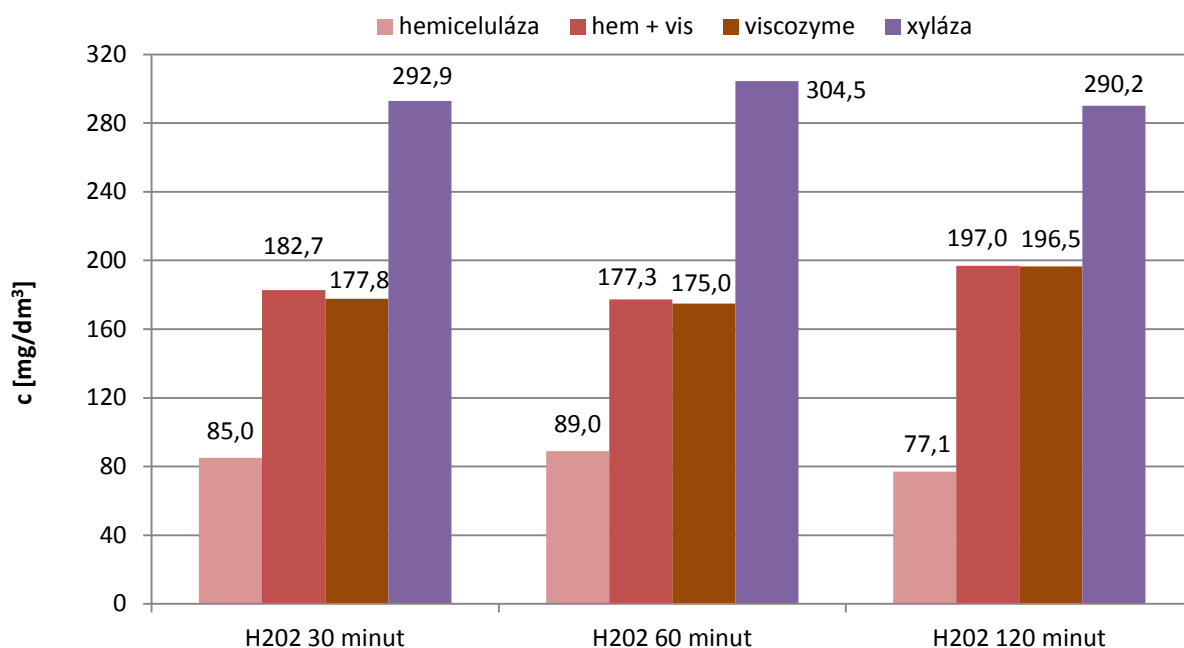
Optimalizace doby luhování pilin v peroxidu vodíku byla zkoumána pro roztok 5 % H₂O₂. Tato koncentrace peroxidu vodíku byla použita, protože v kapitole 4.3.4 měly vzorky připravené právě luhováním v 5 % H₂O₂ po enzymatické hydrolyze nejvhodnější výtěžky cukrů a polyfenolů.

Tabulka 26: Výsledky - luhování pilin v 5 % H₂O₂ (po enzymatické hydrolyze)

5 % H ₂ O ₂		redukující cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
30 minut	hemiceluláza	10,00 ± 0,36	85,1 ± 8,4
	hem + vis	21,68 ± 0,66	182,7 ± 2,0
	viscozyme	12,23 ± 1,47	177,8 ± 0,4
	xylanáza	9,10 ± 0,41	293,0 ± 10,4
60 minut	hemiceluláza	11,32 ± 1,26	89,0 ± 1,1
	hem + vis	23,67 ± 2,96	177,3 ± 1,5
	viscozyme	12,84 ± 0,34	175,1 ± 16,5
	xylanáza	10,63 ± 0,74	304,6 ± 5,7
120 minut	hemiceluláza	12,31 ± 0,04	77,2 ± 1,5
	hem + vis	24,71 ± 0,41	197,0 ± 5,6
	viscozyme	14,73 ± 0,31	196,5 ± 3,1
	xylanáza	9,91 ± 0,10	290,3 ± 19,1



Graf 28: Enzymatická hydrolyza (H₂O₂) - redukující cukry



Graf 29: Enzymatická hydrolyza (H_2O_2) – polyfenoly

Nejvyšší výtěžky redukujících sacharidů byly získány pro vzorky, pro jejichž přípravu byly piliny luhovány v peroxidu vodíku po dobu 120 minut. V předchozím grafu (viz Graf 28) lze pozorovat, že čím delší je doba luhování pilin v peroxidu vodíku, tím větší jsou výtěžky redukujících sacharidů ve vzorcích.

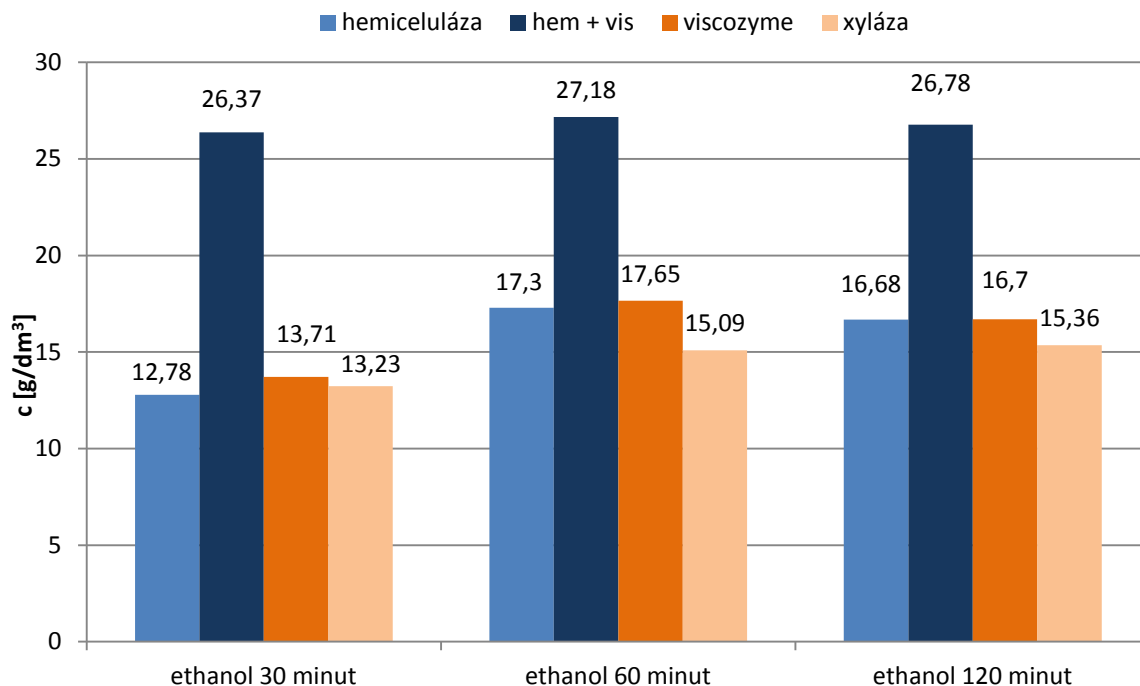
Naopak u koncentrace polyfenolů lze sledovat (viz Graf 29), že se zvyšující se dobou luhování, se zvyšuje také koncentrace polyfenolů ve vzorcích.

4.3.6.3. 96 % ethanol – enzymatická hydrolyza

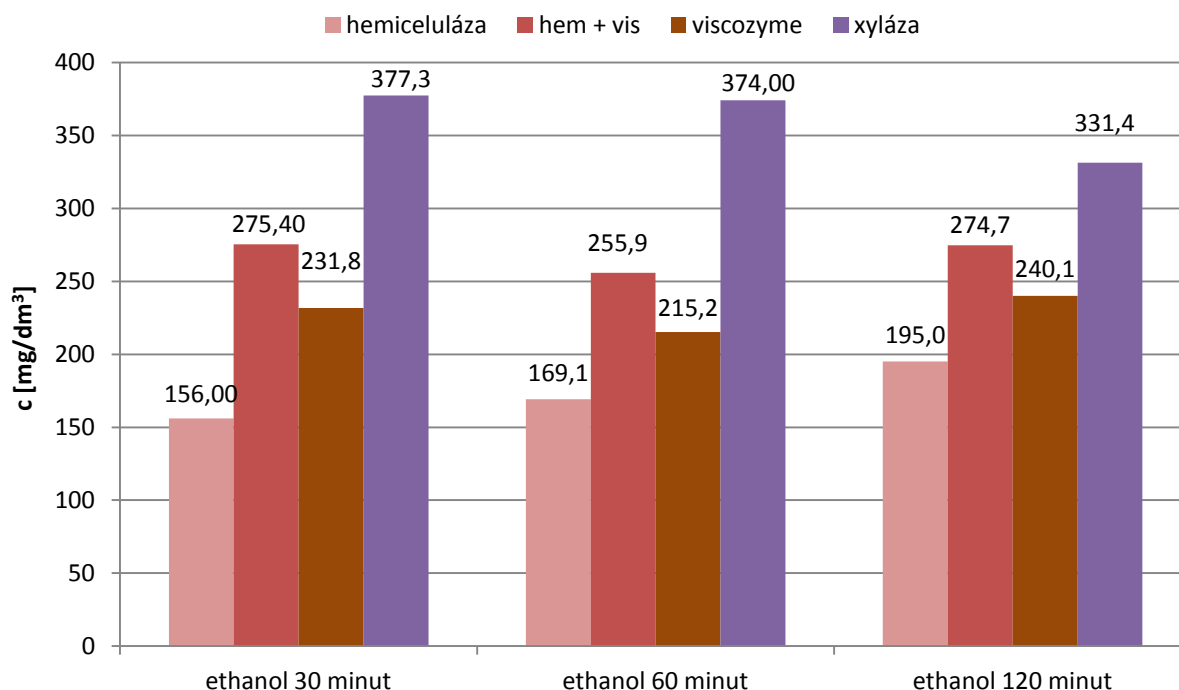
Pro stanovení optimální doby luhování pilin v ethanolu byla vybrána doba: 30 minut, 60 minut a 120 minut. Po vyluhování, vysušení následně kyselá hydrolyza byla pro získané roztoky provedena enzymatická hydrolyza. Její výsledky jsou zobrazeny v následující tabulce.

Tabulka 27: Výsledky - luhování pilin v ethanolu (po enzymatické hydrolyze)

96 % ethanol		redukující cukry [g · dm ⁻³]	polyfenoly [mg · dm ⁻³]
30 minut	hemiceluláza	12,79 ± 0,87	156,1 ± 5,2
	hem + vis	26,37 ± 2,38	275,5 ± 11,1
	viscozyme	13,71 ± 1,76	231,8 ± 1,5
	xylanáza	13,24 ± 1,28	377,3 ± 18,4
60 minut	hemiceluláza	17,31 ± 0,53	169,2 ± 1,1
	hem + vis	27,18 ± 0,12	256,0 ± 8,5
	viscozyme	17,66 ± 1,14	215,3 ± 12,3
	xylanáza	15,09 ± 1,00	374,1 ± 3,7
120 minut	hemiceluláza	16,68 ± 0,68	195,1 ± 3,0
	hem + vis	26,79 ± 0,11	274,7 ± 22,7
	viscozyme	16,71 ± 0,22	240,2 ± 17,0
	xylanáza	15,36 ± 0,82	331,4 ± 2,2



Graf 30: Enzymatická hydrolýza (ETHANOL) - redukující cukry



Graf 31: Enzymatická hydrolýza (ETHANOL) – polyfenoly

V grafu, ve kterém jsou zobrazeny výtěžky redukujících sacharidů (viz Graf 30), lze pozorovat, že optimální doba luhování pilin v roztoku 96 % ethanolu je 60 minut. Zároveň bylo ve vzorcích získaných luhováním pilin v ethanolu po dobu 60 minut nejnižší množství polyfenolů. Koncentrace polyfenolů se dle grafu (viz Graf 31) s rostoucí dobou zvyšovala.

4.4. Biotechnologická produkce PHB na hydrolyzátech

Kultivace vybraných bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byla provedena na hydrolyzátech připravených pomocí zředěné kyseliny (2 % H₂SO₄) bez předchozí předúpravy. Také byla provedena pro hydrolyzáty, které byly podrobeny enzymatické hydrolýze vybranými enzymy.

Po skončení kultivace byla spektrofotometricky stanovena koncentrace residuálních sacharidů, koncentrace polyfenolů a gravimetricky byl stanoven obsah biomasy. Nakonec byl pomocí plynové chromatografie stanoven výtěžek PHB v biomase.

Pro toto stanovení byly vzorky připraveny dle následující tabulky.

Tabulka 28: Příprava vzorků

Předúprava: hydrolýza pomocí 2 % H ₂ SO ₄		
vzorek	BAKTERIE	enzym
1	<i>Burkholderia cepacia</i>	-
2		hemiceluláza (0,5 hm%)
3		hemiceluláza (0,5 hm%) + viscozyme (2,5 obj%)
4		viscozyme (2,5 obj%)
5		xylanáza (0,5 hm%)
6	<i>Burkholderia sacchari</i>	-
7		hemiceluláza (0,5 hm%)
8		hemiceluláza (0,5 hm%) + viscozyme (2,5 obj%)
9		viscozyme (2,5 obj%)
10		xylanáza (0,5 hm%)

4.4.1. Stanovení redukcujících sacharidů

V následující tabulce jsou zobrazeny výsledné koncentrace redukcujících sacharidů v hydrolyzátech pilin před a po kultivaci s vybranými mikroorganismy (viz Tabulka 29).

Tabulka 29: Obsah počátečních redukcujících sacharidů před kultivací a obsah zbytkových redukcujících sacharidů po kultivaci

REDUKUJÍCÍ CUKRY c [g/dm ³]	chemická hydrolýza pomocí 2 % H ₂ SO ₄	chemická hydrolýza + enzymatická hydrolýza hemicelulázou	chemická hydrolýza + enzymatická hydrolýza hemicelulázou a celulázou	chemická hydrolýza + enzymatická hydrolýza Viscozyme	chemická hydrolýza + enzymatická hydrolýza xylanáza
před kultivací	2,21 ± 0,12	8,62 ± 0,06	15,76 ± 0,02	8,15 ± 0,36	10,47 ± 0,07
po kultivaci <i>B. Cepacia</i>	1,08 ± 0,01	0,57 ± 0,13	2,49 ± 0,54	0,63 ± 0,03	0,00
po kultivaci <i>B. Sacchari</i>	0,29 ± 0,04	0,00	0,16 ± 0,02	0,70 ± 0,07	0,94 ± 0,03

V předchozí tabulce lze pozorovat, jaká byla koncentrace redukujících sacharidů před kultivací a po kultivaci, a to buď s bakterií *Burkholderia cepacia* nebo *Burkholderia sacchari*.

Jak je zřejmé, po zaočkování hydrolyzátů mikroorganismy se snížily jednotlivé koncentrace redukujících sacharidů, a to proto, že bakterie pro svůj růst zpracovaly určité množství sacharidů.

Bakterie *Burkholderia sacchari* spotřebovala ve vzorku, který obsahoval enzym hemiceluláza, 100% redukujících sacharidů. Nejméně naopak zpracovala ve vzorku původního hydrolyzátu, a to 86,9% redukujících sacharidů.

V porovnání mezi vybranými bakteriemi lze říci, že bakterie *Burkholderia sacchari*, v hydrolyzátech získaných hydrolyzou ve zředěné kyselině a jejich následnou enzymatickou hydrolyzou, zpracovala oproti bakteri *Burkholderia cepacia* větší množství redukujících sacharidů.

4.4.2. Stanovení polyfenolů

V následující tabulce jsou zobrazeny výsledné koncentrace polyfenolů v hydrolyzátech pilin před a po kultivaci s vybranými mikroorganismy.

Tabulka 30: Obsah polyfenolů sacharidů před kultivací a obsah zbytkových polyfenolů po kultivaci

POLYFENOLY c [mg/dm³]	chemická hydrolyza pomocí 2 % H ₂ SO ₄	chemická hydrolyza + enzymatická hydrolyza hemicelulázou	chemická hydrolyza + enzymatická hydrolyza hemicelulázou a celulázou	chemická hydrolyza + enzymatická hydrolyza Viscozyme	chemická hydrolyza + enzymatická hydrolyza xylanáza
před kultivací	88,8 ± 8,3	146,9 ± 3,3	320,1 ± 15,9	283,3 ± 10,5	533,4 ± 3,4
po kultivaci B. Cepacia	229,3 ± 28,3	739,8 ± 9,4	392,1 ± 6,3	650,3 ± 35,6	488,3 ± 14,7
po kultivaci B. Sacchari	1486,3 ± 76,4	1362,4 ± 91,6	1305,4 ± 32,9	1349,8 ± 2,6	1410,8 ± 32,4

V tabulce jsou zobrazeny koncentrace polyfenolů před kultivací vybranými bakteriemi a po kultivaci. Jak při kultivaci bakterií *Burkholderia cepacia* i *Burkholderia sacchari* se koncentrace polyfenolů zvýšila. Tento obecný jev je velice zajímavý, protože nelze předpokládat, že by bakterie ve větší míře produkovaly fenolické látky. Je však pravděpodobné, že bakterie byly schopny hydrolyzovat ve vodě rozpustné fragmenty ligninu na menší molekuly, které následně při spektrofotometrickém stanovení poskytovaly zdánlivě vyšší hodnotu obsahu fenolických komponent.

4.4.3. Výtěžky biomasy a PHB

Pro hydrolyzáty připravené kultivací s vybranými bakteriemi byly stanoveny výtěžky biomasy. Výsledky jsou zobrazeny v následující tabulce.

Tabulka 31: Výtěžky biomasy

Předúprava: hydrolýza pomocí 2 % H ₂ SO ₄			
vzorek	BAKTERIE	enzym	koncentrace biomasy [g/dm ³]
1	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	1,15 ± 0,01
2		hemiceluláza	1,23 ± 0,05
3		hemiceluláza + viscozyme	0,19 ± 0,01
4		viscozyme	1,13 ± 0,12
5		xylanáza	2,64 ± 0,23
6	<i>Burkholderia sacchari</i>	-	1,02 ± 0,04
7		hemiceluláza	2,55 ± 0,16
8		hemiceluláza + viscozyme	2,12 ± 0,18
9		viscozyme	1,11 ± 0,01
10		xylanáza	1,39 ± 0,02

Zastoupení biomasy se lišilo dle použité bakterie ke kultivaci.

V případě použití bakterie *B. cepacia* byla koncentrace biomasy nejvyšší v hydrolyzátu připraveném hydrolyzováním enzymem xyláza. Naopak nejnižší koncentrace biomasy byla získána při hydrolýze hydrolyzátu kombinací enzymu hemiceluláza a viscozyme, což je velice překvapivé, protože hydrolyzát obsahoval nejvyšší množství redukujících sacharidů. Je však možné, že během enzymatické hydrolýzy se z biomasy nebo u ze samostatných enzymových preparátů uvolňovaly komponenty, které následně inhibovaly růst bakterie *B. cepacia* – u *B. sacchari* nebyla takto významná inhibice růstu pozorována, což dokládá různou sensitivitu testovaných producentů vůči inhibitorům.

Pokud se ke kultivaci použila bakterie *B. sacchari* byla největší koncentrace biomasy v hydrolyzátu, který byl připraven hydrolýzou hemicelulázou a kombinací hemicelulázy a celulázy, tedy na hydrolyzátech s nejvyšším obsahem redukujících sacharidů. Nejnižší koncentrace byla získána v původním hydrolyzátu (bez enzymatické hydrolýzy).

Celkově byly vyšší výtěžky biomasy získány při kultivaci s bakterií *Burkholderia sacchari*.

Tabulka 32: Koncentrace PHB

Předúprava: 2 % H ₂ SO ₄				
vzorek	BAKTERIE	enzym	koncentrace PHB [g/dm ³]	obsah PHB
1	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-
2		hemiceluláza	-	-
3		hemiceluláza + viscozyme	-	-
4		viscozyme	-	-
5		xylanáza	-	-
6	<i>Burkholderia sacchari</i>	-	-	-
7		hemiceluláza	0,2833	27,51%
8		hemiceluláza + viscozyme	0,4892	47,03%
9		viscozyme	0,1323	13,10%
10		xylanáza	0,0401	4,01%

V hydrolyzátech, pro jejichž kultivaci byla použita bakterie *Burkholderia cepacia*, nebyla pomocí plynové chromatografie detekována žádná koncentrace PHB (viz Tabulka 32). Je zřejmé, že bakterie *Burkholderia cepacia* není vhodným produkčním kmenem pro výrobu PHB na připravených hydrolyzátech. Proto byl graf pro srovnání koncentrace biomasy a PHB sestrojen pouze pro hydrolyzáty s kmenem *Burkholderia sacchari*.

Předchozí tabulka srovnává koncentraci PHB ke koncentrací biomasy.

V původní hydrolyzátu (připraven bez enzymatické hydrolýzy) nebylo detekováno žádné množství PHB a ve vzorku připraveném enzymatickou hydrolýzou s xylanázou byla koncentrace PHB nižší než koncentrace biomasy (0,04 g/dm³ ku 1,39 g/dm³).

Nejvyšší koncentrace PHB byla ve vzorku, který byl připraven následujícím způsobem: piliny byly hydrolyzovány v 2 % H₂SO₄, následně byly hydrolyzovány enzymem hemiceluláza a viscozyme a poté byly kultivovány s bakterií *Burkholderia sacchari* (0,49 g/dm³ ku 2,12 g/dm³).

5. ZÁVĚR

- Při chemické hydrolýze pilin byly dosaženy nejlepší výsledky při použití roztoku 96 % ethanolu. Tato metoda předúpravy významně navýšila výtěžky redukujících cukrů po chemické hydrolýze na $6,976 \pm 0,558 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, přičemž bez zařazení tohoto kroku předúpravy byl výtěžek $2,354 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. I přesto, že podobný vzrůstající trend vykazovala také koncentrace polyfenolů, je možné konstatovat, že předúprava materiálu pomocí ethanolu je velice slibnou metodou. Podobných výsledků bylo dosaženo při použití roztoku 5 % H_2O_2 . Z testovaných metod předúpravy je v rámci výtěžku redukujících sacharidů srovnatelná s předúpravou pomocí ethanolu. Koncentrace redukujících sacharidů při aplikaci peroxidu vodíku byla $6,007 \pm 0,657 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.
- Pro chemickou hydrolýzu v 96 % ethanolu a 5 % peroxidu vodíku byla také optimalizována doba luhování pilin. U použití ethanolu bylo zjištěno, že optimální doba luhování pilin v něm je 60 minut. Koncentrace redukujících sacharidů byla po kyselé hydrolýze v získaném hydrolyzátu stanovena na $7,171 \pm 0,489 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pokud se piliny luhovaly v 5 % H_2O_2 bylo zjištěno, že optimální doba luhování pilin v tomto roztoku byla 120 minut. Koncentrace redukujících sacharidů byla ale nižší než u 96 % ethanolu.
- Na enzymatickou hydrolýzu, která následovala po chemické hydrolýze, byly použity komerčně dostupné enzymy Viscozyme L celullotic enzyme mixture, Hemicellulase from *Aspergillus niger*, endo-1,4- β -xyllanase from *Trichoderma longibrachiatum* a Cellulase from *Trichoderma reesei*. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při předúpravě pilin pomocí jejich luhování v 5 % H_2O_2 , 96 % ethanolu a v roztoku 5 % NaOH.
- Po chemické a enzymatické hydrolýze bylo dosaženo nejvyšších hodnot při luhování pilin v roztoku 96 % ethanolu po dobu 60 minut. Při použití hemicelulázy byla koncentrace redukujících cukrů $17,31 \pm 0,53 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, při použití enzymu Viscozyme byla $17,66 \pm 1,14 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a kombinací těchto enzymů bylo dosaženo hodnoty $27,18 \pm 0,12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.
- Pokud byla kombinace enzymů Viscozyme a hemiceluláza použita pro enzymatickou hydrolýzu vzorků připravených luhováním pilin v roztoku 5 % NaOH po dobu 60 minut a následné kyselé hydrolýze, byla koncentrace redukujících sacharidů stanovena na $26,53 \pm 0,20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. V případě použití hydrolyzátu pilin luhovaných v 5 % H_2O_2 po dobu 120 minut byla tato koncentrace rovna $24,71 \pm 0,41 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.
- Koncentrace polyfenolů byla po chemické i po enzymatické hydrolýze nejnižší v hydrolyzátu připraveném luhováním pilin v roztoku 5 % H_2O_2 a jeho následné kyselé a enzymatické hydrolýze.

- Kultivace bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byla uskutečněná na vzorcích hydrolyzátu, který byl připraven kyselou hydrolýzou pilin a jeho následnou enzymatickou hydrolýzou.
- Pomocí plynové chromatografie byl u těchto vzorků stanoven obsah PHB a koncentrace biomasy. Vyšší koncentrace biomasy byla získána při kultivaci bakterie *Burkholderia sacchari*, a to u hydrolyzátů připravených pomocí enzymu hemiceluláza $2,55 \pm 0,16 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, anebo s kombinací enzymu hemiceluláza a celulóza $2,12 \pm 0,18 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Obsah PHB po kultivaci na médiu s hydrolyzátem pilin byl u této bakterie nejvyšší pro vzorek, který byl kultivován kombinací enzymu hemiceluláza a celulóza. Koncentrace PHB byla $0,4892 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, což je 47,03% PHB z celkové koncentrace biomasy.
- V hydrolyzátech, pro jejichž kultivaci byla použita bakterie *Burkholderia cepacia*, nebyla pomocí plynové chromatografie detekována žádná koncentrace PHB. Je zřejmé, že bakterie *Burkholderia cepacia* není vhodným produkčním kmenem pro výrobu PHB na připravených hydrolyzátech.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(1), 10-18. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>
2. MENON, Vishnu a Mala RAO. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, **38**(4), 522-550. DOI: 10.1016/j.pecs.2012.02.002. ISSN 03601285. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036012851200007X>
3. AKHTAR, Nadeem, Kanika GUPTA, Dinesh GOYAL, et al. Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass: An overview. *Environmental Progress*. 2016, **35**(2), 489-511. DOI: 10.1002/ep.12257. ISSN 19447442. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ep.12257>
4. AGBOR, Valery B., Nazim CICEK, Richard SPARLING, Alex BERLIN a David B. LEVIN. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 2011, **29**(6), 675-685. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000607>
5. FAN, L. T., Yong-Hyun LEE a David H. BEARDMORE. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*, Volume 14. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1980, , 101. DOI: 10.1007/BFb0007190. ISBN 3-540-09621-3. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BFb0007190>
6. PENG, Feng, Pai PENG, Feng XU a Run-Cang SUN. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*. 2012, **30**(4), 879-903. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.018. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975012000316>
7. BURANOV, Anvar U. a G. MAZZA. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*. 2008, **28**(3), 237-259. DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.03.008. ISSN 09266690. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669008000630>
8. Biomass Composition and Its Relevance to Biorefining. *The role of catalysis for the sustainable production of bio-fuels and bio-chemicals*. Boston: Elsevier, 2013, s. 27-59. ISBN 978-0-444-56330-9.
9. JÖNSSON, Leif J. a Carlos MARTÍN. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, **199**, 103-112. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415014042>
10. Paulová Leona, Kačaba Jan, Patáková Petra, Rychtera Mojmír, Melzoch Karel, DEGRADAČNÍ PRODUKTY VZNIKAJÍCÍ PŘI FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ PŘEDÚPRAVĚ LIGNOCELULOSOVÉ BIOMASY A JEJICH VLIV NA EFEKTIVITU PROCESU VÝROBY BIOETHANOLU. *Chemické listy*, (106), pp.626-631.

11. KUMAR, Parveen, Diane M. BARRETT, Michael J. DELWICHE a Pieter STROEVE. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial*. 2009, **48**(8), 3713-3729. DOI: 10.1021/ie801542g. ISBN 10.1021/ie801542g. ISSN 0888-5885. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie801542g>
12. VENKATESWAR RAO, Linga, Jyosthna Khanna GOLI, Jahnavi GENTELA a Sravanthi KOTI. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*. 2016, **213**(37), 299-310. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.092. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416305880>
13. SUN, Shaoni, Shaolong SUN, Xuefei CAO a Runcang SUN. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*. 2016, **199**, 49-58. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.061. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415011670>
14. ZHANG, Ke, Zhijian PEI a Donghai WANG. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*. 2016, **199**, 21-33. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.102. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415012080>
15. RAUD, M., M. TUTT, J. OLT a T. KIKAS. Dependence of the hydrolysis efficiency on the lignin content in lignocellulosic material. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2016, **41**(37), 16338-16343. DOI: 10.1016/j.pecs.2014.01.001. ISSN 03603199. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319915308181>
16. MAITAN-ALFENAS, Gabriela Piccolo, Evan Michael VISSER a Valéria Montez GUIMARÃES. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*. 2015, **1**, 44-49. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.10.001. ISSN 22147993. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799314000101>
17. JØRGENSEN, Henning, Manuel PINELO, W.S. GUO, et al. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries: An overview. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2017, **11**(1), 150-167. DOI: 10.1002/bbb.1724. ISSN 1932104x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bbb.1724>
18. PALMQVIST, Eva a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, **74**(1), 25-33. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852499001613>
19. ZHANG, Junhua, Ming TANG a Liisa VIKARI. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresource Technology*. 2012, **121**, 8-12. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.010. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412010577>
20. YANG, Bin, Ziyu DAI, Shi-You DING a Charles E WYMAN. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*. 2011, **2**(4), 421-450. DOI: 10.4155/bfs.11.116. ISSN 1759-7269. Dostupné také z: <http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bfs.11.116>

21. SAINI, Jitendra Kumar, Anil Kumar PATEL, Mukund ADSUL a Reeta Rani SINGHANIA. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renewable Energy*. 2016, 98, 29-42. DOI: 10.1016/j.renene.2016.03.089. ISSN 09601481. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116302737>
22. RAHIKAINEN, Jenni, Saara MIKANDER, Kaisa MARJAMAA, Tarja TAMMINEN, Angelos LAPPAS, Liisa VIIKARI a Kristiina KRUUS. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, **108**(12), 2823-2834. DOI: 10.1002/bit.23242. ISSN 00063592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.23242>
23. ESCAMILLA-ALVARADO, Carlos, José A PÉREZ-PIMIENTA, Teresa PONCE-NOYOLA a Héctor M POGGI-VARALDO. An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries. *Journal of Chemical Technology*. 2016, , -. DOI: 10.1002/jctb.5088. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5088>
24. CHEN, Hongzhang a Weihua QIU. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*. 2010, **28**(5), 556-562. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.005. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501000056X>
25. RAUD, M., M. TUTT, J. OLT a T. KIKAS. Dependence of the hydrolysis efficiency on the lignin content in lignocellulosic material. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2016, **41**(37), 16338-16343. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.03.190. ISSN 03603199. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319915308181>
26. KUMAR, G., P. BAKONYI, S. PERIYASAMY, S.H. KIM, N. NEMESTÓTHY a K. BÉLAFI-BAKÓ. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, **44**, 728-737. DOI: 10.1016/j.rser.2015.01.042. ISSN 13640321. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115000520>
27. KHAN, M.A., H.H. NGO, W.S. GUO, et al. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion: An overview. *Bioresource Technology*. 2016, **219**(37), 738-748. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.073. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416312019>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

c	koncentrace
A	absorbance
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)